DIE NATURWISSENSCHAFTEN

30. Jahrgang | 19. Juni 1942 | Heft 25/26

ZWEITES HEFT ZU HEINRICH WIELANDS 65. GEBURTSTAG.

Zum enzymatischen Abbau und zur Struktur der Nucleinsäuren.

Von F. G. FISCHER, Würzburg.

Die Molekülgröße der Nucleinsäuren.

Dem ersten Untersucher der chemischen Bestandteile des Zellkerns, MIESCHER, war die hochmolekulare Natur der Nucleinsäuren deutlich bewußt. Aus tausendfältiger histologischer Beobachtung und chemischer Erfahrung (1868—1893) gewann er die Anschauung des „Nucleins" als einer vielbasischen, nichtdialysierenden Säure, deren Haftung an Eiweiß in verschiedenen Objekten recht verschieden sein kann. Die Lachsspermien vor allem, mit ihren „colossalen Haufen eines Stoffes von rabiatem Phosphorgehalt" waren ihm Gegenstand unablässiger Bemühungen zur Gewinnung der möglichst unversehrten Kernsubstanzen.

Auch in der folgenden Forschungsperiode wurde der Zustand dieser phosphorhaltigen Säuren in den Zellen nicht aus den Augen verloren und mit dem nach ihrer Gewinnung verglichen. Im KOSSELschen Arbeitskreis (1879—1913) sind nicht nur durch Abbau mit Säuren und Laugen die Grundbestandteile der Nucleinsäuren ermittelt, sondern auch einige Haupterscheinungen ihrer enzymatischen Veränderungen beobachtet worden, wie z. B. die Abspaltung der Basen und der Phosphorsäure oder der auffällige Übergang der zähflüssigen Gallerten eines Salzes der sog. a-Thymo-nucleinsäure in die dünnflüssigen Lösungen der b-Säure.

Als dann aber in den folgenden Jahrzehnten (von 1900 an) die Forschung sich notwendigerweise den Detailfragen der Nucleinsäurestruktur zuwandte, der Kennzeichnung der Basen (Ia bis Va) und der Zuckerbestandteile (VI und VII), der Bestimmung ihrer Bindung zu Nucleosiden und deren Verknüpfung mit Phosphorsäure zu Nucleotiden (z. B. VIII), da verlor sich offenbar das richtige Gefühl für die Molekülgröße der nativen Säuren und für die Beurteilung der Veränderungen bei ihrer präparativen Herstellung. Es ist jedenfalls erstaunlich, daß in diesem bis zur Gegenwart reichenden Forschungsabschnitt die eifrigsten Bearbeiter des Gebietes eine „Tetranucleotid-Struktur" beider Arten von Nucleinsäuren annahmen, nicht nur in dem Sinne einer Zusammensetzung aus verschiedenen Nucleotiden mit den vier verschiedenen Basen, Zucker und Phosphorsäure, sondern auch in jenem der Molekülgröße. Unter dieser Annahme sind, z. B. aus Basizitätsbestimmungen von fragwürdigem Wert, strukturelle Forderungen gezogen und genaue Formelbilder ausführlich diskutiert worden; und das trotz der eingehenden Arbeit von E. HAMMARSTEN (1923) über die physikalischen Eigenschaften kolloidaler Thymo-nucleinat-Lösungen und den Versuchen FEULGENS (1923) über die Umwandlung der gallertbildenden a-Thymo-nucleinsäure in die b-Form.

Es steht heute durch verschiedene Beobachtungen fest, daß in den Molekülen der Thymonucleinsäure (Desoxyribo-nucleinsäure) sehr viele Nucleotid-Einheiten verknüpft sind und daß auch die Hefe-Nucleinsäure (Ribo-nucleinsäure), wenngleich bedeutend niederermolekular, ein Vielfaches von 4 Nucleotiden im Molekülverband enthält. Bei Thymonucleinat-Lösungen läßt sich aus den Erscheinungen der Viscosität und der Strömungsdoppelbrechung[1]), weiterhin aus ihrem Verhalten bei der Ultrazentrifugation[2, 3]) folgern, daß Fadenmoleküle vorliegen, deren Länge einige hundertmal größer als die Dicke ist, mit Molekulargewichten, die je nach der von den Nucleinsäuren erlittenen Vorbehandlung 50000 bis zu über 1 Million betragen können. Es sind also mindestens Hunderte von Nucleotiden, vielleicht auch Tausende, zu einem Molekül zusammengefügt. Die Größe der Anisotropie der optisch negativen, also senkrecht zur Längsachse am stärksten polarisierbaren Moleküle deutet auf eine regelmäßige Anordnung der doppelbrechenden Bestandteile hin[4, 1]). Diese Beobachtungen, zusammen mit jenen der Röntgenuntersuchung[5]), ergeben die Vorstellung von aneinandergeschichteten, zur Längsrichtung des Moleküls senkrecht stehenden Nucleotid-Scheibchen, aus einem Pyrimidin-Ring oder einem Purin-Doppelring und dem Ring der Desoxyribose gefügt und durch Phosphorsäure zum Molekülfaden verklammert (VIII). Die Messung des Ultraviolett-Dichroismus gerichteter Thymo-nucleinat-Gallerten scheint allerdings zu ergeben, daß die im Ultraviolett absorbierenden Gruppen, die Basen, entweder alle nicht völlig senkrecht zur Achse eingestellt sind, oder daß nur etwa die Hälfte diese Lagerung hat[6]).

Die Nucleinsäure aus Hefe ist sicher nicht so hochmolekular wie die Thymo-nucleinsäure: In den Lösungen ihrer Salze ist bei ähnlichen Strömungsgeschwindigkeiten keine Doppelbrechung nachzuweisen[7]). Die Geschwindigkeit der Diffusion durch großporige Membranen (die Thymo-nucleinsäure gar nicht durchlassen) deutet auf Molekülgrößen hin, welche die Verknüpfung von durchschnittlich 30 Mononucleotid-Einheiten voraussetzen[8]). Die Dialysen-Methode ist jedoch für Bestimmungen von Molekulargewichten dieser Größe

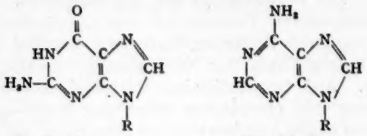
nicht mehr recht geeignet; genauere Untersuchungen mit besseren Verfahren fehlen bei dieser Säure noch. Schon bei den bisherigen Ergebnissen ist zu bedenken, daß Hefe-Nucleinsäure durch Alkali-Einwirkung gewonnen wird, und daß sie in alkalischer Lösung eine schnelle hydrolytische Aufspaltung erleidet. Tatsächlich enthalten Handelspräparate in wechselnder Menge auch Bestandteile von niederem Molekulargewicht. Es ist wahrscheinlich, daß in der Pilzzelle die Säure durchschnittlich größere Moleküle bildet.

Die Ribo-nucleinsäuren, wie die Hefe-Nucleinsäure, scheinen in vivo als Salze vorzuliegen; sie lassen sich jedenfalls schon durch schwache Alkali-Einwirkung und sofort ausziehen. In der Hauptmenge sicherlich nicht als Salze liegen jedoch die desoxyribose-haltigen Säuren vom Typus der Thymus-Nucleinsäure vor. Ihre Abtrennung vom Eiweiß setzt entweder eine grobe Behandlung mit starken Alkalien voraus oder den Ablauf enzymatischer Hydrolysen. Aus einfachen Versuchen geht hervor, daß z. B. bei der Gewinnung der Thymus-Nucleinsäure nach BANG-HAMMARSTEN die Säure — und entsprechend das Histon — erst durch Fermentwirkungen frei gemacht wird[9]). Sie muß im Kern der Lymphozyten auch durch Covalenzen mit Eiweiß verknüpft sein, wahrscheinlich mittels eines Teiles der Phosphorsäure-Gruppen durch Amid- oder Esterbindungen. Es ist fraglich, ob selbst die Spermien eine Ausnahme bilden und wirklich einfache Salze aus Nucleinsäure und basischem Eiweiß enthalten. Die Versuche von MIESCHER schienen dafür zu sprechen; die später angegebenen Verfahren zur Gewinnung von Kernsäuren und Protaminen aus Lachs- und Heringsmilch schließen jedoch durchweg enzymatische Hydrolysen ein.

Man erkennt, daß das Problem der Struktur der Nucleinsäuren und ihres Bindungszustandes in der Zelle sich nicht erschöpft mit jenem der Verknüpfung von vier verschiedenen Nucleotiden zu einem salzartig vorliegenden Tetranucleotid.

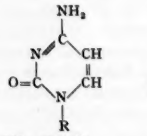
Die Erkenntnis der großen Zahl von Mononucleotiden in einem Nucleinsäure-Molekül entzieht überhaupt die Berechtigung zur Postulierung von Tetranucleotid-Einheiten — wenigstens zunächst. Denn das annähernd äquimolekulare Verhältnis, in dem die vier Nucleotide, genauer gesagt die vier Basen der Ribo-nucleinsäuren (Ia, IIa, IIIa und IVa) und die vier der Desoxyribonucleinsäuren (Ia, IIa, IIIa und Va) nachgewiesen worden sind, kann auch bei regelloser Anordnung der Komponenten als statistischer Mittelwert zustande kommen. Es braucht nicht Ausdruck zu sein von einer Verkettung der einzelnen Nucleotide zu wiederkehrenden, in sich gleich geordneten Vierergruppen. Ebensowenig wie z. B. bestimmte Molekülverhältnisse einzelner Aminosäuren in einem Protamin etwas über die Reihenfolge der Verknüpfung dieser Aminosäuren aussagen.

Die Ergebnisse aller bisherigen Versuche zur Ermittlung der Stellung der einzelnen Nucleotide im „Tetranucleotid" können nur von sehr beschränkter Beweiskraft sein, weil sie tatsächlich mit höhermolekularen Nucleinsäuren angestellt wurden und die ersten Wirkungen des Abbaus mit Säuren oder Laugen vielleicht wenig spezifisch, jedenfalls noch undurchsichtig sind. Die Verfolgung der enzymatischen Hydrolyse, vom ersten Eingriff in die hochmolekulare Säure bis zur Abspaltung des letzten Phosphorsäure-Restes, verspricht eine zuverlässigere Ermittlung der Nucleinsäure-Struktur und tiefere Einblicke in ihre im Lebenden möglichen Veränderungen.

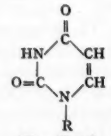


Ia: Guanin. *Ib:* Guanosin. *Ic:* Guanin-desoxyribosid.

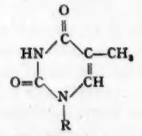
IIa: Adenin. *IIb:* Adenosin. *IIc:* Adenin-desoxyribosid.



IIIa: Cytosin. *IIIb:* Cytidin. *IIIc:* Cytosin-desoxyribosid.

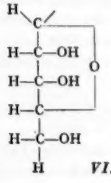


IVa: Uracil. *IVb:* Uridin.

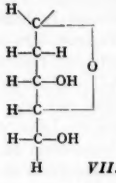


Va: Thymin. *Vc:* Thymin-desoxyribosid.

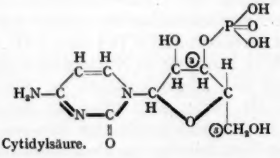
a) R = H. *b*) R = Ribosid-Rest. *c*) R = Desoxyribosid-Rest.



VI.



VII.



VIII. Cytidylsäure.

Die enzymatische Hydrolyse zu Oligonucleotiden.

Zur Untersuchung der ersten Abbauschritte haben sich Fermente der Pankreas-Drüse bewährt. Die Thymo-polynucleotidase verflüssigt nicht nur Gallerten von a-Nucleinat-Lösungen unter Bildung der nicht mehr gelatinierenden, aber noch mit Mineralsäuren fällbaren b-Nucleinsäure, übt also nicht nur eine „Nucleogelase"-Wirkung aus[10]: Mit stark wirksamen Fermentpräparaten greift die Hydrolyse tiefer ein und führt zu säurelöslichen, offensichtlich niedermolekularen Nucleotiden, zu *Oligonucleotiden* also[11]). Der Abbau äußert sich in einem starken Abfall der Viskosität und in einer starken Zunahme der Leitfähigkeit und des osmotischen

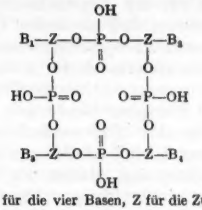
Druckes der Nucleinat-Lösungen. Er bewirkt eine Zunahme der freien Säuregruppen, und zwar bis zu 1 Acidität auf 4 Phosphoratome, aber nicht darüber. Da die hochmolekulare Säure 1 freie Säuregruppe pro Phosphoratom hat, auf die Tetranucleotid-Einheit berechnet also vierbasisch ist, sind die entstandenen Oligonucleotide, auf die gleiche Einheit bezogen, fünfbasisch. Schon das legt den Verdacht nahe, daß sie *Tetranucleotide* sind (X). Die Bestimmung der Geschwindigkeit ihrer Diffusion durch eine Membran, die dementsprechende Molekulargewichte ergibt, bestätigt die Vermutung. Durch fraktionierte Dialyse ließ sich bisher keine Auftrennung in niedere und höhermolekulare Bestandteile erreichen[12]). Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die Polynucleotidase das kolloidale, Hunderte von Nucleotid-Resten enthaltende Thymo-nucleinat-Molekül bis zu Tetranucleotid-Einheiten hydrolysiert, aber nicht weiter.

Die nächstliegende Annahme zur Deutung dieser Aufteilung des Nucleinat-Fadens in gleich große Stücke ist die, daß die vier verschiedenen Nucleotide in periodischer Folge im Säuremolekül angeordnet sind, daß also der Tetranucleotid-Einheit, für die bisher keinerlei experimentelle Hinweise bestanden, als Bauelement der Thymo-nucleinsäure eine reelle Bedeutung zukommt. Die Spezifität der Polynucleotidase zu einer besonderen, alle vier Nucleotid-Reste wiederkehrenden Bindung würde die spezifische Hydrolyse bedingen.

Das Freiwerden der Säuregruppen zeigt an, daß, so wie die Mononucleotide im Tetranucleotid, auch die Tetranucleotid-Einheiten untereinander ausschließlich durch Phosphorsäure gebunden sind. Auch die Polynucleotidase ist also eine Phosphatase. Freilich eine Phosphatase von enger Spezifität, denn sie ist allen bisher geprüften anderen Phosphorsäure-Derivaten gegenüber wirkungslos: sowohl Phosphorsäure-monoestern, wie -diestern, wie -amiden, wie Pyrophosphorsäure-estern[8]).

Auch auf Hefe-Nucleinsäure erstreckt sich ihre Wirkung nicht. Diese Säure wird von einem anderen, ebenfalls aus Pankreas zu gewinnenden, aber sicher davon verschiedenen Ferment hydrolysiert, von der hitzebeständigen Ribo-polynucleotidase, die kürzlich bis zur Kristallisation gereinigt werden konnte[13]).

Es drängt sich die Frage auf, ob auch beim Abbau der Hefesäure durch dieses Ferment Tetranucleotide gebildet werden. ALLEN und EILER[14]) wiesen unlängst nach, daß die kristallisierte Polynucleotidase eine Vermehrung der freien Säuregruppen bewirkt, so daß auf je vier der vorhandenen Aciditäten *eine* neue entsteht. Die Verhältnisse sind also gleich wie bei der Thymo-nucleinsäure. Von den genannten Autoren sind zwei Möglichkeiten zur Deutung ihres Ergebnisses diskutiert worden: entweder die Hydrolyse eines höhermolekularen Nucleotids zu Tetranucleotiden oder, was ihnen offenbar wahrscheinlicher vorkommt, die hydrolytische Öffnung eines cyclischen Tetranucleotids. Eine solche Ringstruktur (IX) für die Hefe-Nucleinsäure, die der tatsächlichen Molekülgröße nicht gerecht wird, ist zuerst von TAKAHASI zur Erklärung der spezifischen Wirkung von Phosphatasen angenommen, später von MAKINO zur Deutung ihrer Tetrabasizität angewandt und auch auf die Thymo-nucleinsäure übertragen worden. Doch ist auch bei einem höhermolekularen „offenen" Polynucleotid, wenn das Verhältnis der endständigen zu den mittelständigen Phosphorsäuregruppen klein ist, angenähert eine Säuregruppe pro Nucleotid-Rest frei. Auch die Ergebnisse der Dephosphorylierung mit spezifischen Phosphatasen, die von einigen Autoren für die cyclische Formel ins Feld geführt wurden[15]), sind bei einem solchen Polynucleotid größtenteils verständlich.



IX. (B_1—B_4 steht für die vier Basen, Z für die Zuckerkomponente.)

Nun läßt sich durch Diffusionsmessungen nachweisen, daß Hefe-Nucleinsäure unter der „Ribonuclease"-Wirkung zu niedermolekularen Oligonucleotiden hydrolysiert wird[8]); das entscheidet zugunsten der ersten der oben erwähnten Möglichkeiten. Die in jenen Messungen ermittelten Molekulargewichte sind zwar niedriger als die von Tetranucleotiden, wahrscheinlich infolge einer nachträglichen nichtenzymatischen Spaltung, doch läßt der von ALLEN und EILER bestimmte Säurezuwachs auf eine Bildung dieser Gruppen schließen. Danach wären auch bei den Ribo-nucleinsäuren Tetranucleotid-Einheiten in irgendwie ausgezeichneter Weise zusammengeschlossen.

Die Bindungs-Spezifität der Ribo-Polynucleotidase ist noch unbekannt, so daß die Frage nach der besonderen Verknüpfung der Ribo-oligonucleotide untereinander durch die enzymatische Spaltung einstweilen offengelassen wird — so wie bei den Thymo-oligo-nucleotiden auch.

Einige Hinweise auf die Beantwortung dieser Frage erhält man aus Versuchen zur Methylierung und zur Desaminierung beider Arten von Nucleinsäuren[16]). Die Methylierung von Thymo-nucleinat-Gallerten mit Dimethylsulfat in sehr schwach alkalischer Lösung wird von einem hydrolytischen Abbau begleitet, der schon an der Verflüssigung erkennbar ist. Je nach dem erreichten Methylierungsgrad ist die Molekülzerteilung mehr oder weniger weitgehend; in einem Versuche enthielten z. B. die methylierten Oligonucleotide im Durchschnitt nur noch an die 20 Mononucleotid-Reste. Mit Hefe-Nucleinsäure ist der Abbau bei weitem nicht so auffallend; immerhin entstehen bei gleicher Behandlung methylierte *Oligo*nucleotide, z. B. mit durchschnittlich 10 Resten. Aus Versuchen mit Modellsubstanzen geht nun hervor, daß unter gleichen Methylierungsbedingungen wohl Phos-

phorsäure-amide, nicht aber Phosphorsäure-ester aufgespaltet werden.

Die Einwirkung von salpetriger Säure in essigsaurer Lösung, die zu einer Desaminierung der drei Amino-Basen (Ia, IIa, IIIa) führt, hydrolysiert Thymo- und Hefesäure ebenfalls tiefgreifend zu desaminierten Oligonucleotiden. Der Abbau ist an den Veränderungen der Viscosität, der Löslichkeit und der Dialysiergeschwindigkeit unzweifelhaft zu erkennen. Auch bei dieser Reaktion läßt sich mit Vergleichssubstanzen zeigen, daß Phosphorsäureamide, nicht aber -ester unter gleichen Verhältnissen hydrolytisch gespalten werden.

Dieses ganze Verhalten der hochmolekularen Säuren, besonders der Thymo-nucleinsäure, führt also zur Annahme, daß sie außer den Phosphorsäure-ester- auch Phosphorsäure-*amid*-Bindungen enthalten. Von anderen Autoren ist zwar gerade aus Desaminierungsversuchen geschlossen worden, daß Stickstoff-Phosphor-Bindungen weder in der Hefe- noch in der Thymo-nucleinsäure vorliegen[17, 18]. Dieser Schluß scheint nur möglich, wenn die Molekülgrößen der Säuren vor und nach der Desaminierung nicht richtig erkannt werden.

Da innerhalb der Thymo-tetranucleotid-Einheiten, wie weiter unten erwähnt, Phosphamid-Bindungen ausgeschlossen sind, könnte man vermuten, daß solche Bindungen bei jedem vierten Nucleotid-Rest vorkommen; jedoch fehlen noch stichhaltige Beweise. Hingegen gibt es zahlreiche Anzeichen dafür, daß allzu einfache Bauprinzipien der Struktur der Nucleinsäuren nicht gerecht werden. Es sei nur auf die Nucleinsäuren aus Pankreas hingewiesen, mit angeblich „pentanucleotidischer" Struktur, oder auf das Verhalten der Hefe-Nucleinsäure gegen spezifisch wirkende Phosphatasen[15]. Bei den Thymo-nucleinsäuren wäre selbst eine Verklammerung von Oligonucleotid-Einheiten durch nicht-nucleotidische Bestandteile, wie Diaminosäuren oder Oxyaminosäuren, zu erwägen; durch die nur bedingt zuverlässigen Analysenwerte der hochmolekularen Säuren wird sie bisher nicht ausgeschlossen.

Die üblichen schematischen Strukturformeln der Nucleinsäuren sind Spiegelbilder unserer Unkenntnis.

Die Struktur der Oligo-nucleotide.

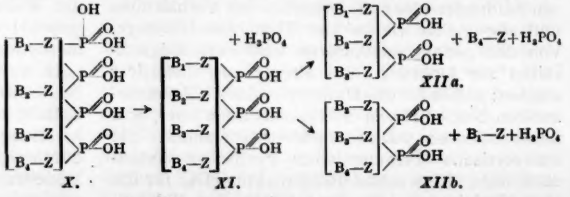
Die enzymatische Bildung der Tetranucleotide — bei der Thymussäure weitgehend gesichert, bei der Hefesäure sehr wahrscheinlich — läßt jedenfalls diese Vierergruppen als Bauelemente der Nucleinsäuren hervortreten. Die für die hochmolekularen Säuren meistens stillschweigend gemachte Annahme einer bestimmten Anordnung der Nucleotide gewinnt für diese Einheiten an Wahrscheinlichkeit. Bei ihrer Strukturbestimmung treten einem also die gleichen Fragen entgegen, die bei den Nucleinsäuren selbst oft genug aufgeworfen worden sind: Durch welche Bindung sind die Mononucleotide miteinander verknüpft und welche ist ihre Reihenfolge?

Zunächst die Desoxyribo-tetranucleotide (X): Sie sind fünfbasisch und gegen Alkalien wesentlich unempfindlicher als die Thymonucleinsäure selbst; die alkalibeständigeren Phosphorsäure-Bindungen sind also noch in ihnen enthalten[12]. Durch salpetrige Säure läßt sich völlige Desaminierung der drei Amino-Basen Guanin, Adenin und Cytosin erreichen, ohne daß eine Aufspaltung des Moleküls eintritt, wie die Bestimmung des unverändert bleibenden Molekulargewichts zeigt[16]. Die Verknüpfung der Mononucleotide kann also nicht über die Aminogruppen der Basen durch Phosphorsäureamid-Bindungen erfolgen. Es bleibt nur die Möglichkeit von Ester-Bindungen, entweder beiderseitig mit den Zuckerhydroxylen (in 3 und 5, siehe Formel VIII) oder, weniger wahrscheinlich, mit den Zuckerhydroxylen und den Oxygruppen der drei sauerstoffhaltigen Basen Guanin, Cytosin und Thymin.

Bei den enzymatisch hergestellten Hefe-Oligonucleotiden fehlen noch entsprechende Versuche; doch ist auch bei ihnen das Vorliegen einer Phosphamid-Bindung unwahrscheinlich. Die umstrittene Isolierung von Guanin-uridylsäure (mit einer Phosphor-Stickstoff-Bindung) nach saurer Hydrolyse von Hefe-Nucleinsäure hat wohl ihre Bedeutung verloren, nachdem die Autoren selbst diese Säure als sekundär gebildetes Produkt betrachten[18].

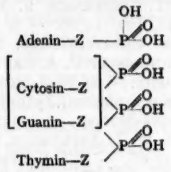
Beim weiteren Abbau der Thymo-tetranucleotide durch enzymatische Dephosphorylierung zeigt es sich, daß zwei Fermente mitwirken[12]. In der Darmschleimhaut sind beide reichlich enthalten; eine völlige Trennung ist bisher nicht gelungen, doch schon ein Nachweis der Verschiedenheit ihrer Wirkungen. Die sekundären Phosphorsäure-Bindungen zwischen den Nucleosiden der Tetranucleotid-Einheit (X) werden von einer Oligo-nucleotidase gelöst, die letzte Esterbindung in den dadurch entstehenden Mononucleotiden von einer Mononucleotidase. Seiner Wirkung nach gehört das erste Ferment also zu den Phospho-diesterasen, das zweite zu den Phospho-monoesterasen.

Durch mononucleotidase-reiche, aber oligonucleotidase-arme Fermentpräparate wird aus dem Tetranucleotid ein Viertel der Gesamt-Phosphorsäure besonders schnell abgespalten; wahrscheinlich ist es die nur einfach veresterte Säuregruppe (siehe X). Es muß ein Trinucleotid-nucleosid (XI) hinterbleiben, bei dessen weiterer Dephosphorylierung ein Dinucleotid-nucleosid gebildet wird (XII). Wenn die Abspaltung der zweiten Phosphorsäure mit glei-



cher Geschwindigkeit von beiden Seiten des Trinucleotid-nucleosids (XI) erfolgt, dann ist zu erwarten, daß zwei verschiedene, und zwar die außenständigen Nucleoside B_1-Z und B_4-Z in gleicher Menge freigelegt werden. Das verbleibende Dinucleotid-nucleosid ist dann ein Gemisch aus XIIa und XIIb.

Nach hälftiger Dephosphorylierung der Thymotetranucleotide mit gereinigter Nucleotidase enthält die phosphorfreie Fraktion nur *ein* Mol Nucleosid und besteht tatsächlich aus etwa gleichen Teilen zweier Nucleoside, nämlich Adenin-desoxyribosid (IIc) und Thymin-desoxyribosid (Vc). Das leicht zu erkennende Guanin-desoxyribosid (Ic) ist gar nicht abgespalten worden; Mononucleotide sind in der Lösung nicht vorhanden. Nach diesen Ergebnissen würde die Anordnung der vier Thymonucleotide im Tetranucleotid dem Formelbild XIII entsprechen, wobei die Reihenfolge der beiden innenständigen Komponenten unbestimmt ist.



XIII.

Die noch nicht abgeschlossenen Versuche[19]) mit Hefe-oligonucleotiden (durch Ribo-polynucleotidase-Wirkung entstanden) haben insofern ein analoges Bild gegeben, als nach 50proz. Dephosphorylierung nur *ein* Mol eines Nucleosid-Gemisches frei ist, das kein Guanosin enthält, sondern hälftig aus Adenosin (IIb) besteht. Danach wäre auch im Ribo-oligonucleotid Adenylsäure, aber nicht Guanylsäure außenständig.

Nach BREDERECK, BERGER und RICHTER[18]) wird durch Erhitzen der Hefe-nucleinsäure mit wässerigem Pyridin zu allererst Guanylsäure, dann Adenylsäure abgespalten. Diese Erscheinung, die bei einigen Präparaten, doch nicht bei allen beobachtet werden konnte, ließ im „Tetranucleotid" eine Anordnung vermuten mit außenständiger Guanylsäure und dieser benachbarten — oder am anderen Ende stehender — Adenylsäure, führte also gerade zu einem dem obenerwähnten teilweise entgegengesetzten Schluß. Nun ist, wie schon betont, die Hefe-Nucleinsäure kein einfaches Tetranucleotid; daher kann die Ursache der Abspaltungsreihenfolge schwerlich rein räumlicher Natur sein.

Bei der Thymo-nucleinsäure sind ebenfalls schon Vermutungen über die Anordnung der Nucleotide ausgesprochen worden: Da nach saurer Hydrolyse Diphosphorsäure-Derivate beider Pyrimidin-nucleoside isoliert werden können[22]), sollten Purin- und Pyrimidin-Reste im „Tetranucleotid" sich abwechseln. Auch hier bestehen die grundsätzlich gleichen Bedenken. Solange aus der hochmolekularen Säure weniger als die Hälfte der theoretisch möglichen Menge dieser Diphospho-Verbindungen gewonnen wird, beweist der Befund nur, daß die Dephosphorylierung der Purin-nucleoside durch Säuren schneller erfolgt als die der Pyrimidin-nucleoside.

Auch gegenüber den Ergebnissen der erwähnten enzymatischen Spaltungen von *Tetra*nucleotiden ist jedoch Vorsicht geboten: Denn sie gehen alle auf Verschiedenheiten in den Hydrolysen-Geschwindigkeiten von Phosphorsäure-Bindungen zurück; für Schlußfolgerungen auf räumliche Anordnungen können sie erst dann voll beweiskräftig sein, wenn auch die Dephosphorylierungs-Geschwindigkeiten der einzelnen Nucleotide durch die angewandten Fermentpräparate genau bekannt sein werden. Frühere fragmentarische Beobachtungen[21]) lassen erkennen, daß die Dephosphorylierung durch Phosphatasen aus Darmfistelsaft bei Pyrimidin-ribonucleotiden schneller erfolgt als bei Purin-nucleotiden, gerade umgekehrt also wie durch Säuren oder Alkalien.

Leider ist die Darstellung der Thymo-mononucleotide, die für diese Bestimmungen erforderlich wären, nach wie vor eine schlecht gelöste Aufgabe. Nach KLEIN[22]) hemmen Arsenat-Ionen die Dephosphorylierung von Mononucleotiden durch Darmschleimhaut-Fermente, nicht aber ihre Bildung aus dem Polynucleotid. Im Gegensatz zu diesen Angaben läßt sich jedoch eine Hemmung auch der Oligonucleotidase durch Arsenat nachweisen, die jener der Mononucleotidase kaum nachsteht. Führt man die gehemmte Hydrolyse so, daß eine Bildung freier Phosphorsäure aus den Mononucleotiden vermieden wird, dann ist auch das Oligo-nucleotid höchstens zu einem Fünftel aufgespalten[16]).

Wie aus diesen Darlegungen ersichtlich, kann von einer festbegründeten Kenntnis der Reihenfolge der nucleotidischen Bausteine in den hochmolekularen Säuren noch nicht die Rede sein; doch eine Voraussetzung dazu ist durch die enzymatische Bildung der Oligonucleotide schon geschaffen.

Zu dem Stoffwechsel und dem mikroskopischen Nachweis der Nucleinsäuren.

Die Methoden der Zellfärbung und in neuerer Zeit die Bestimmung der Ultraviolett-Absorption mikroskopischer Objekte (T. CASPERSSON) haben eine eingehende Kenntnis der Lokalisation von Nucleinsäuren und ihrer Veränderung bei cytologischen Prozessen vermittelt. Demgegenüber steht eine fast völlige Unkenntnis der enzymatischen Reaktionen der Nucleine, die mit den Vorgängen der Zellteilung und des Zellwachstums einhergehen. Die von E. HAMMARSTEN hervorgehobene Fähigkeit der Thymo-nucleinsäure, auf geringfügige Milieu-Einflüsse durch starke Veränderung ihrer Eigenschaften als Kolloid zu reagieren und damit den physikalisch-chemischen Zustand der Zellkern-Substanz zu beherrschen, tritt besonders hervor, wenn unter einer Polynucleotidase-Wirkung umkehrbare hydrolytische Vorgänge die Molekülgröße verändern. Der nachgewiesenen Möglichkeit einer enzymatischen Aufspaltung zu Tetranucleo-

tid-Einheiten mag eine besondere Bedeutung zukommen: Es wird eine Mobilisierung der kolloidalen Substanz und ihre Zerlegung in echt lösliche, diffusionsfähige, osmotisch stark wirkende Bruchstücke erreicht, unter Wahrung einer vermutlich in diesen Einheiten gegebenen Ordnung.

Auf eine cytologisch bemerkenswerte Eigenschaft der Tetranucleotide sei hingewiesen: Sie sind leicht wasser- und säurelöslich und entgehen daher den Kernfärbungen und auch der FEULGENschen Nuclealreaktion. Nun ist es eine häufige, an zahlreichen Objekten (sowohl Protisten wie Metaphyten und Metazoen) gemachte Beobachtung, daß die Veränderungen des Chromatins bei der Ausbildung des Ruhekerns so weit gehen können, daß die Chromosomen „achromatisch" werden. Diese als „Verdünnung" oder „Verschwinden" oder „Verbrauch" der anfärbbaren Substanz gedeutete Erscheinung ist z. B. auch bei Oogenesen und Spermatogenesen festgestellt worden.

Zur Deutung der Unterschiede zwischen den mitotischen Chromosomen und dem Interphasen-Kern haben KIESEL[23]) und MILOWIDOW eine Umwandlung der gallertbildenden a-Thymonucleinsäure in die nichtgelatinierende b-Säure durch „Nucleogelase"-Wirkung angenommen. Ein Abbau bis zu dieser Stufe würde aber nicht genügen, um das „Verschwinden" des Euchromatins der Matrix zu erklären. Denn die b-Thymo-nucleinsäure ist noch in Salzsäure unlöslich und gibt daher, wie FEULGEN und ROSSENBECK besonders feststellten, die Nuclealreaktion. Die Molekülzerteilung muß weiter gehen, wahrscheinlich bis zu den säurelöslichen Tetranucleotiden. In einem Briefe MIESCHERS[24]) findet sich folgende Bemerkung zu jener Entwicklungsphase der „Hodenzellen" des Lachses, in der nach Schwellung des Kerns „alles sich zu einer glasigen homogenen Masse von sehr mäßiger Lichtbrechung" aufgelöst hat: „... die Veränderung ist eine chemische. Während vorher das Nuclein auf Salzsäurezusatz in dicken Klumpen sich zusammenballte, löst sich nunmehr unter denselben Umständen alles auf, bis auf die zu einem kleinen Klümpchen zusammenschrumpfende Hautschicht".

Durch Vergleich der Ultraviolett-Absorption, die auch gelöste Nucleotide erfaßt, mit den Anfärbungen, die höhermolekulare Polynucleotide anzeigen, und Feststellung der Löslichkeitseigenschaften, muß sich erkennen lassen, welche Zellvorgänge eine tatsächliche Minderung oder Mehrung nucleotidischer Stoffe einbegreifen und welche eine bloße Hydrolyse oder Kondensation. Bei cytoplasmatischen Nucleotiden ist eine Vermehrung bei raschen Zellteilungs- und Wachstumsvorgängen sichergestellt[25]). Unseres Wissens gehören sie dem Ribose-Typ zu; doch sei daran erinnert, daß die Unterscheidung häufig auf das Ausbleiben der Nuclealreaktion, nicht auch auf einen Nachweis des Zuckerbestandteils begründet wurde. Nach dem Gesagten erscheint auch das intermediäre Auftreten von niedermolekularen Desoxyribose-Nucleotiden in größeren Konzentrationen sehr wohl möglich, vielleicht auch im Cytoplasma; ihre Diffusionsfähigkeit würde einen solchen Stoffaustausch zwischen Kern und Plasma jedenfalls gestatten.

Im abgestorbenen, autolysierenden Gewebe entstehen sie sehr schnell aus der hochmolekularen Säure; bei der Gewinnung der letzteren werden daher mehr oder weniger große Anteile als Oligonucleotid erhalten.

Literatur.

[1]) R. SIGNER, T. CASPERSSON u. E. HAMMARSTEN, Nature (Lond.) **141**, 122 (1938). — [2]) T. SVEDBERG u. F. PEDERSEN, The Ultrazentrifuge. 1940. — [3]) G. SCHMIDT, E. G. PICKELS u. P. A. LEVENE, J. of biol. Chem. **127**, 251 (1939). — [4]) W. J. SCHMIDT, Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma. Protoplasma-Monogr. 11 (1937) — Naturwiss. **25**, 506 (1937). — [5]) W. T. ASTBURY u. F. BELL, Nature (Lond.) **141**, 747 (1938). — [6]) T. CASPERSSON, Chromosoma **1**, 605 (1940). — [7]) Zit. n. CASPERSSON, l. c. — [8]) F. G. FISCHER, I. BÖTTGER u. H. LEHMANN-ECHTERNACHT, Hoppe-Seylers Z. **271**, 246 (1941). — [9]) Nach unveröffentlichten Beobachtungen. — [10]) R. FEULGEN, Hoppe-Seylers Z. **237**, 261 (1935); **238**, 105 (1935). — [11]) F. G. FISCHER, H. LEHMANN-ECHTERNACHT u. I. BÖTTGER, J. prakt. Chem. **158**, 79 (1941). — [12]) H. LEHMANN-ECHTERNACHT, Hoppe-Seylers Z. **269**, 169, 187 u. 201 (1941). — [13]) M. KUNITZ, Science (N. Y.) **90**, 112 (1939). — [14]) F. W. ALLEN u. J. J. EILER, J. of biol. Chem. **137**, 757 (1941). — [15]) J. M. GULLAND, J. chem. Soc. (Lond.) **1938**, 1722. — [16]) Bisher unveröffentlichte Versuche mit H. LEHMANN-ECHTERNACHT. — [17]) H. BREDERECK, M. KÖTHNIG u. G. LEHMANN, Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 2613 (1938). — [18]) H. BREDERECK, E. BERGER u. F. RICHTER, Ber. dtsch. chem. Ges. **74**, 338 (1941). — Siehe auch J. M. GULLAND u. E. M. JACKSON, J. chem. Soc. (Lond.) **1939**, 1842. — [19]) Mit I. BÖTTGER. — [20]) P. A. LEVENE, J. of biol. Chem. **126**, 63 (1938). — [21]) P. A. LEVENE u. DILLON, J. of biol. Chem. **88**, 753 (1930). — [22]) W. KLEIN u. S. J. THANNHAUSER, Hoppe-Seylers Z. **231**, 96 (1935). — [23]) A. KIESEL, Chemie des Protoplasmas. Protoplasma-Monogr. 4 (1930). — [24]) Über ALTMANNS Granulalehre (1895). In den Gesammelten Werken S. 127. — [25]) In Tumorzellen: T. CASPERSSON, C. NYSTRÖM u. L. SANTESSON, Naturwiss. **29**, 29 (1941). — In Preßhefe: T. CASPERSSON u. K. BRANDT, Protoplasma (Berl.) **3**, 507 (1941).

Synthese des Biliverdins (Uteroverdins) und Bilirubins.

Von HANS FISCHER und HANS PLIENINGER, München.

Gallenfarbstoffe sind in der Natur weit verbreitet. Bei den Säugetieren wird die Farbstoffkomponente des Hämoglobins unter Abspaltung des Globins und des komplexgebundenen Eisens in Bilirubin umgewandelt. Dieser Prozeß erfolgt im wesentlichen in der Leber, aber auch an anderen Stellen; denn nach Blutergüssen, z. B. im Gehirn bei Schlaganfällen, tritt Hämatoidinbildung ein,

Hämatoidin ist mit Bilirubin identisch. In Placentahämatomen des Hundes, aber auch vieler anderer Tiere, tritt der Gallenfarbstoff Uteroverdin auf, der auch als Biliverdin bezeichnet wird. Er ist ein Dehydrierungsprodukt des Bilirubins, und so erklärt sich auch sein Vorkommen in der Galle. Künstlich kann Bilirubin leicht in Biliverdin umgewandelt werden. Auch der rückläufige Prozeß ist durchführbar (vgl. S. 386). Oocyan, der grünblaue Farbstoff vieler Vogeleierschalen, scheint auch mit Biliverdin identisch zu sein. Neuerdings wurde von H. WIELAND und A. TARTTER[1]) in den Flügelpigmenten bei Schmetterlingen ein Gallenfarbstoff in Verbindung mit Eiweiß beobachtet, der Pterobilin genannt wurde. Pterobilin wurde bei den drei häufigsten Kohlweißlingarten, Pieris brassicae, Pieris rapae, Pieris napi, angetroffen. Auch beim Citronenfalter (Gonepterix rhamni) wurde es gefunden. Viel Pterobilin war auch in den Flügeln zweier brasilianischer Catopsilien, C. rurina und C. statira (Näheres S. 386).

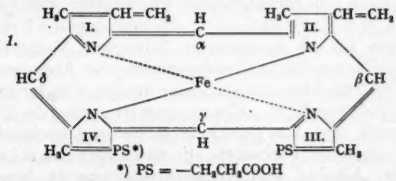
Auch in der Pflanzenwelt sind Gallenfarbstoffe enthalten, vor allen Dingen in Rotalgen, interessanterweise auch hier in Verbindung mit Eiweiß, eine Tatsache, die die chemische Untersuchung erschwert. Der Ursprung der Gallenfarbstoffe in den Algen ist noch unbekannt.

Nachdem in den Pflanzen, ebenso auch in der Hefe, Hämin nachweisbar ist, ist eine sekundäre Entstehung der Gallenfarbstoffe möglich, ebenso wie die direkte primäre Synthese. Nachdem Hefe, die ja Hämin und Porphyrine enthält, imstande ist, Hämin in Gallenfarbstoffe überzuführen, wäre ein sekundäres Entstehen durchaus möglich. Versuche, durch Pflanzenextrakte Blutfarbstoffe in Gallenfarbstoffe überzuführen, sind zur Zeit im Gange.

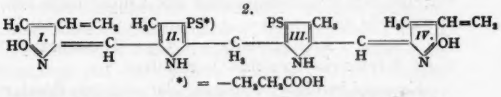
Gallenfarbstoffe sind also in der Tier- und Pflanzenwelt weit verbreitet. Bei systematischer Untersuchung sind sicherlich noch weitere Funde zu erwarten. Allerdings ist die Literatur auf dem Gebiet der Pflanzen- und Tierfarbstoffe schwer zu überblicken. Ein Lehrbuch über die vergleichende Chemie der Pflanzen und Tiere existiert leider bis jetzt nicht. Dies wäre sicher eine lohnende Aufgabe, wodurch zweifellos sehr viele Anregungen gegeben würden, abgesehen von dem wissenschaftlichen Gewinn an sich. Von den physiologischen Eigenschaften des Bilirubins und seiner Derivate ist in den letzten Jahren vor allen Dingen seine erythropoetische Wirkung bemerkenswert, die hauptsächlich durch die Arbeiten VERZÁRS und seiner Schule bekannt geworden ist[2]), wobei interessanterweise auch relativ einfache Pyrrole wirksam sind.

Isoliert wurde das Bilirubin zum erstenmal von F. STÄDELER[3]) aus Rindergallensteinen, die fast ausschließlich neben Eiweiß aus den Kalk- bzw. Magnesiumsalzen des Bilirubins bestehen. Cholesterin und Gallensäuren treten vollkommen zurück. Im Gegensatz zu den Rindergallensteinen enthalten die menschlichen Gallensteine nur sehr wenig Bilirubin, das Hauptprodukt ist Cholesterin, das in Äther sehr leicht löslich ist. Das Bilirubin aus menschlichen Gallensteinen ist identisch mit dem aus Rindergallensteinen, auch aus Galle ist Bilirubin abscheidbar. Bilirubin, $C_{33}H_{36}O_6N_4$, ist eisenfrei, besitzt ein Kohlenstoffatom weniger und 2 Sauerstoffatome mehr als das Hämin, das die empirische Formel $C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$ hat. Während Hämin und seine Derivate durch charakteristische spektroskopische Erscheinungen ausgezeichnet sind, fehlen diese dem Bilirubin. Nur eine uncharakteristische Absorption im Blau ist vorhanden [[4]) S. 632]. Bilirubin ist eine leicht veränderliche Substanz, was seine Untersuchung sehr erschwert. Es ist ausgezeichnet durch eine Reihe schöner Farbreaktionen, von denen die GMELINsche Farbreaktion sowie die EHRLICHsche Diazoreaktion schon lange bekannt sind. Sehr charakteristisch ist auch die Zinkacetat-Jod-Reaktion [[4]) S. 632], die durch ein relativ scharfes Absorptionsspektrum ausgezeichnet und zur Unterscheidung des Bilirubins von seinen Derivaten äußerst geeignet ist, da die spektroskopische Erscheinung in Abhängigkeit steht von der Natur der Seitenketten. Zur Erkennung von Umwandlungen an diesen ist die Reaktion deswegen sehr brauchbar und sie hat auch bei der Synthese uns viele gute Dienste geleistet.

Zahlreiche Arbeiten waren notwendig, um den Zusammenhang zwischen Hämin und Bilirubin[4]) zu ermitteln. Wie wir wissen, wird Hämin[5]) durch folgende Formulierung wiedergegeben:



und beim Übergang in Bilirubin wird die α-Methingruppe oxydativ herausgespalten unter Eintritt von 2 OH-Gruppen in die Kerne I und II der Formel (1). Gleichzeitig erfolgt eine Hydrierung am γ-Kohlenstoffatom und dem benachbarten Kern, so daß dem Bilirubin dann folgende Formulierung (2) zuzuerteilen ist:



Bilirubin entspricht also in der Anordnung der Seitenketten prinzipiell dem Hämin (und ebenso dem Chlorophyll), eine Tatsache, die weiter erhärtet ist durch die Synthesen von Mesobilirubin IX, Glaukobilin IX und Urobilin IX durch W. SIEDEL und Mitarbeiter[6]).

Bei der Synthese des Bilirubins bildete ebenso wie beim Hämin die Einführung der Vinylgruppen sowie der unsymmetrische Bau besondere Schwierigkeiten. Dazu steht im Kern IV die Oxygruppe

unter der Vinylgruppe, eine Anordnung, die auch bei der analytischen Untersuchung die Konstitutionsaufklärung des Bilirubins sehr erschwert hat, weil die zweite Hälfte des Bilirubins außerordentlich leicht der Vernichtung anheimfällt. Während z. B. bei der Resorcinschmelze des Bilirubins die „linke" Seite des Moleküls in Form der Vinylneoxanthobilirubinsäure (17)[7]) isolierbar ist, geht die „rechte" Seite, die die Isovinylneoxanthobilirubinsäure (18) geben sollte, verloren. Aus demselben Grund ist offenbar auch das Bilirubin gegen Säuren sehr empfindlich und so erklärt es sich, daß bei der Eisessig-Jodwasserstoff-Reduktion des Bilirubins im wesentlichen nur die „linke" Seite des Moleküls in Form der Bilirubinsäure einheitlich faßbar ist.

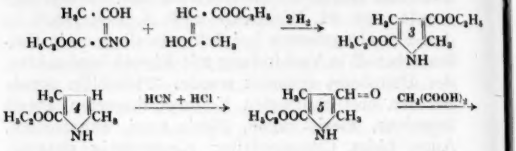
Interessanterweise nimmt jedoch die Säureempfindlichkeit außerordentlich ab, wenn eine Dehydrierung an der mittelständigen Methylengruppe und dem benachbarten Kern unter Biliverdinbildung stattgefunden hat. Wenn dann noch Absättigung der Vinylgruppen hinzukommt, wie das bei der Glaukobilinbildung der Fall ist, tritt sogar Beständigkeit gegen konzentrierte Schwefelsäure ein.

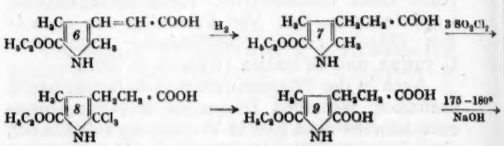
Es lag deshalb nahe, die Synthese des Biliverdins anzusteuern, um so mehr, als vor kurzem auch die Rückverwandlung des Biliverdins in Bilirubin gelungen war[8]).

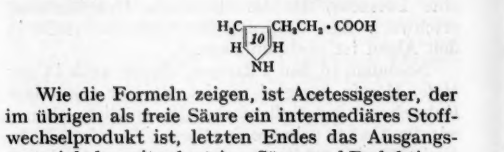
Unsere Versuche zur Biliverdinsynthese gehen auf einige Jahre zurück. Nahe lag es, nachdem die Synthese von bilirubinoiden Farbstoffen schon seit 1931 [[3]) S. 647] bekannt ist, die gewonnenen Erfahrungen für die Synthese zu benützen. Vergeblich wurde versucht, in Oxymethenen, die Acetylreste als Seitenketten trugen, diese in die Vinylgruppe überzuführen[9]), [10]). Ebenso negativ verlief die Einführung der Acetylreste in β-Stellung geeigneter bilirubinoider Farbstoffe, die dann über den sekundären Alkohol und Wasserabspaltung in Vinylgruppen übergeführt werden sollten, eine Methode, die ja seinerzeit bei der Synthese des Hämins aus Deuterohämin zum Ziel geführt hatte. Ein dritter Weg schien gegeben durch die Umwandlung von Propionsäureresten in Vinylgruppen [[4]) S. 569][11]). Durch Kombination des CURTIUSschen und des HOFMANNschen Abbaues gelang es, in der Porphyrinreihe den Propionsäurerest zur Vinylgruppe abzuwandeln und wurde so z. B. aus Koproporphyrin das schön kristallisierte 1,3,5,7-Tetramethyl-2,4,6,8-tetravinylporphin[11]) erhalten.

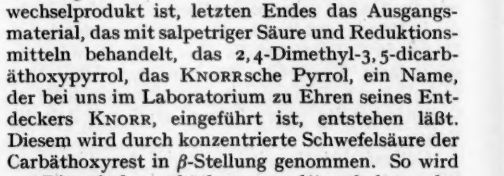
Koprobilirubin [[4]) S. 659ff.] ist von uns bereits 1932 synthetisiert. Es trägt 4 Methylgruppen und 4 Propionsäurereste in β-Stellung, und wenn es eine Methode gäbe, selektiv 2 Propionsäurereste in Vinylgruppen umzuwandeln, so wäre auf diesem Wege die Synthese eines Isobilirubins möglich. Eine solche Synthese würde aber nicht gleichzeitig einen Konstitutionsbeweis erbringen.

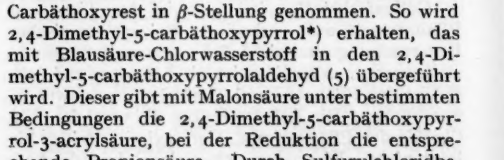
Die Synthese des Biliverdins gelang durch zweckentsprechende Anwendung des CURTIUSschen Abbaues auf die beiden Oxyopsopyrrolcarbonsäuren[12]) und die Kondensation der Zwischenprodukte mit Pyrrolaldehyden im *alkalischen* Medium, die in guter Ausbeute zu Oxypyrromethenen führt, wie PLIENINGER gefunden hatte. Auf zwei Wegen führten wir dann die *Totalsynthese* des Biliverdins durch, und zwar war die Opsopyrrolcarbonsäure (10), ein Spaltprodukt des Blut-, Blatt- und Gallenfarbstoffs, das Ausgangsmaterial[4]), deren Synthese wir schon vor etwa 15 Jahren durchgeführt haben, und zwar auf folgendem Wege:





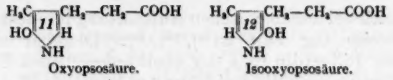






Wie die Formeln zeigen, ist Acetessigester, der im übrigen als freie Säure ein intermediäres Stoffwechselprodukt ist, letzten Endes das Ausgangsmaterial, das mit salpetriger Säure und Reduktionsmitteln behandelt, das 2,4-Dimethyl-3,5-dicarbäthoxypyrrol, das KNORRsche Pyrrol, ein Name, der bei uns im Laboratorium zu Ehren seines Entdeckers KNORR, eingeführt ist, entstehen läßt. Diesem wird durch konzentrierte Schwefelsäure der Carbäthoxyrest in β-Stellung genommen. So wird 2,4-Dimethyl-5-carbäthoxypyrrol*) erhalten, das mit Blausäure-Chlorwasserstoff in den 2,4-Dimethyl-5-carbäthoxypyrrolaldehyd (5) übergeführt wird. Dieser gibt mit Malonsäure unter bestimmten Bedingungen die 2,4-Dimethyl-5-carbäthoxypyrrol-3-acrylsäure, bei der Reduktion die entsprechende Propionsäure. Durch Sulfurylchloridbehandlung und Alkali entsteht die Estercarbonsäure (9), die durch Erhitzen mit 10proz. Natronlauge im Autoklaven auf 175—180° ihrer beiden α-ständigen Carboxylgruppen beraubt wird, und es bildet sich die Opsopyrrolcarbonsäure (10). Diese mit Perhydrol in Pyridin behandelt, gibt die beiden isomeren Oxyopsosäuren (11) und (12), deren Trennung durch systematische Kristallisation möglich ist.

*) Dieses Pyrrol (4) war bzw. ist für sämtliche Porphyrin- und Gallenfarbstoffsynthesen, ebenso für die der Chlorophyllderivate von größter Bedeutung. Hunderte von Kilo wurden uns von der Direktion der I.G. Farbenindustrie Aktiengesellschaft, Werk Leverkusen, in den letzten 15 Jahren zur Verfügung gestellt. Auch an dieser Stelle sei der verbindlichste Dank ausgesprochen.

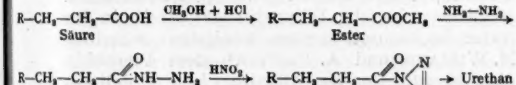


Oxyopsosäure. Isooxyopsosäure.

In ihnen ist die freie Methingruppe verhältnismäßig reaktionsträge; so ist z. B. die EHRLICHsche Reaktion mit Dimethyl-aminobenzaldehyd negativ, während die Kupplungsreaktion mit Diazoverbindungen allerdings positiv ist. Es läßt sich aber die Aldehydgruppe nicht einführen, auch mit Chloroform-Kalilauge tritt weder Aldehydbildung noch Dioxypyrromethenbildung ein.

An sich ist diese hemmende Wirkung der Oxygruppe überraschend, da sonst zumeist nach Eintritt von Oxygruppen erhöhte Aktivität in Ringsystemen erzeugt wird. Man denke nur an den Unterschied der Reaktionsfähigkeit des Benzols und Phenols oder des Phenylalanins und Tyrosins.

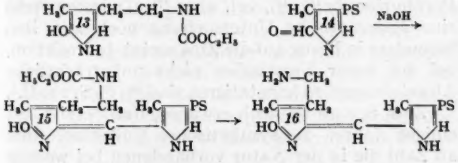
In beiden Oxyopsosäuren wurden nun die Seitenketten folgenden Umwandlungen unterzogen, d. h. letzten Endes wurde der Propionsäurerest zum Urethan umgebaut entsprechend folgendem Reaktionsschema:



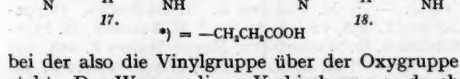
Säure Ester

Hydrazid Azid (13)

Es wurde also so erhalten das Urethan-oxypyrrol untenstehender Formulierung (13). Dieses Urethan wurde nun mit dem Aldehyd der Opsopyrrolcarbonsäure (14) im alkalischen Medium in ausgezeichneter Ausbeute zum Oxypyrromethen (15) kondensiert,



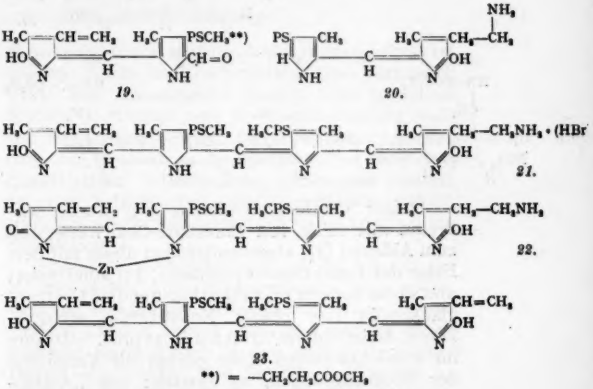
aus dem mit Hilfe von konzentrierter Lauge die 5'-Oxy-4',3-dimethyl-3'-ω-aminoäthyl-dipyrrylmethen-4-propionsäure (16) erhältlich ist. Dieses Aminoäthyl-oxypyrromethen konnte unter Verwendung seines Zinksalzes durch HOFMANNschen Abbau in die Vinylneoxanthosäure (17) bzw. ihren Ester, in kristallisiertem Zustand übergeführt werden. Schmelz- und Mischschmelzpunkt mit analytischem Präparat[7]) waren übereinstimmend. Damit war die „linke" Hälfte des Bilirubins [vgl. Formel (2)] synthetisiert. Die „rechte" Seite des Moleküls entspricht einer Isovinylneoxanthosäure folgender Formulierung (18):



17. 18.

*) = $-CH_2CH_2COOH$

bei der also die Vinylgruppe über der Oxygruppe steht. Der Weg zu dieser Verbindung war durch die obigen Synthesen vorgezeichnet. Es war notwendig, die Iso-oxyopsosäure den oben beschriebenen Umwandlungen zu unterziehen, um damit dann das Methen (20) folgender Formulierung zu erhalten, das in β-Stellung den Aminoäthylrest trägt, der, wie oben ausgeführt, in die Vinylgruppe überführbar ist.

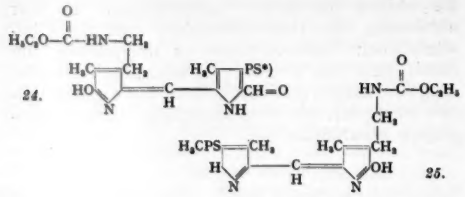


19. 20. 21. 22. 23.

**) = $-CH_2CH_2COOCH_3$

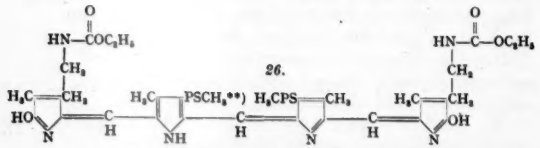
Zur Synthese des Biliverdins IXα handelte es sich nun darum, die Vinylneoxanthosäure mit der ebengenannten Isovinylneoxanthosäure durch eine Methingruppe zu verknüpfen, wobei natürlich ebensogut statt der Isovinylneoxanthosäure auch ihre Vorstufen, z. B. das Aminoäthyl-iso-oxy-pyrromethen (20) dienen konnte. Für die Erzeugung der verbindenden Methingruppe wurde die Vinylneoxanthosäure in den Aldehyd (19) übergeführt, der durch Methylalkohol-Bromwasserstoff-Einwirkung mit dem Aminoäthyl-iso-oxypyrromethen (20) kondensiert wurde. Es entstand als bromwasserstoffsaures Salz obiges Aminoglaukobilin (21), das in der Anordnung der Seitenketten mit dem natürlichen Bilirubin bzw. Biliverdin übereinstimmte, in dem nur noch die Aminoäthylseitenkette in die Vinylgruppe übergeführt werden mußte. Interessanterweise läßt sich die Methylierung der Aminogruppe nicht ohne Komplikationen durchführen. Es scheint Methylierung am Stickstoff einzutreten und vielleicht auch noch Ringspaltung, Reaktionen, die noch eingehender untersucht werden müssen. Diese Schwierigkeiten lassen sich vermeiden durch Überführen in das Zinksalz, das durch komplexe Bindung die für unsere Zwecke unerfreulichen Nebenreaktionen verhindert. Beim Zinksalz verlief nunmehr die Methylierung glatt und durch Erhitzen mit methylalkoholischer Kalilauge und nach chromatographischer Reinigung konnte dann Biliverdin IXα (23) in schön kristallisiertem Zustand erhalten werden. Schmelz- und Mischschmelzpunkt der Ester mit analytischem Präparat waren identisch, auch das DEBYE-SCHERRER-Diagramm.

Eine zweite Biliverdinsynthese wurde auf folgendem Wege durchgeführt:



24.

25.



26.

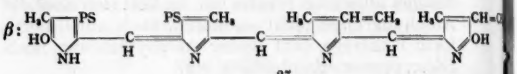
Obiges Urethan-oxymethen (15) wurde wiederum mit Hilfe von Blausäure-Chlorwasserstoff zum Aldehyd (24) abgewandelt und dieser mit dem Ester des Isourethan-oxymethens (25) kondensiert und so das äußerst kristallisationsfreudige Urethanglaukobilin (26) obiger Konstitution erhalten. Durch dreistündiges Erhitzen in 38proz. Salzsäure im zugeschmolzenen Rohr gelingt die Verseifung der Urethangruppen, es entsteht das „Aminohydrochlorid", das nach Überführung ins Zinksalz, Methylierung und Trimethylaminabspaltung ins Biliverdin übergeführt wurde, das wiederum mit Biliverdin IXα in allen Eigenschaften übereinstimmte.

Auf zweifache Art ist somit die Totalsynthese des natürlichen Biliverdins erbracht.

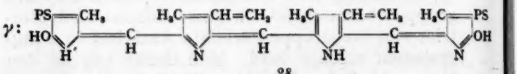
Die Rückführung des Biliverdins in Bilirubin haben wir bereits vor kurzem[8]) beschrieben. Durch Reduktion mit Zinkstaub-Eisessig in der Kälte oder alkalische Reduktion bei Zimmertemperatur mit Hydrosulfit ist Überführung möglich. Aus Chloroform tritt bald Kristallisation eines gelbroten Körpers ein, der in allen Eigenschaften und Reaktionen, auch der Kupplungsreaktion, mit Bilirubin identisch war. Im DEBYE-SCHERRER-Diagramm bestand Übereinstimmung.

Somit ist durch obige Synthesen auch die Synthese des natürlichen Bilirubins durchgeführt.

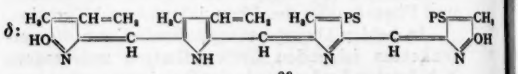
Diese Synthesen lassen sich mannigfach variieren, und es ist so eine außerordentliche Bereicherung der Synthesenmöglichkeit bilirubinoider Farbstoffe gegeben. Auch wird sich die Frage nach der Einheitlichkeit des Bilirubins am ehesten auf synthetischem Wege beantworten lassen. Bilirubin besitzt ja keinen Schmelzpunkt und außerordentlich wechselnde Löslichkeitsverhältnisse. Infolgedessen ist eine restlose Identifikation schwierig, bzw. es ist schwer, ein Gehalt eines allenfallsigen Isomeren auszuschließen. Ein Gehalt eines fremden Bilirubinoids von 2—3% z. B. wäre schwer oder gar nicht erkennbar. Nun ist die Möglichkeit der Existenz isomerer Bilirubine bzw. Biliverdine durchaus nicht von der Hand zu weisen, denn Hämin obiger Formulierung (1) kann ja an jeder der 4 Methingruppen aufgespalten werden, wie das ja auch bei der chemischen Aufspaltung mindestens teilweise der Fall ist[13]), [14]), [15]). Denkbar sind außer Biliverdin IXα der oben angegebenen Formulierung noch die drei folgenden Isomeren (β, γ, δ), deren Synthese in Anriff genommen ist und nach Kenntnis ihrer Eigenschaften wird ein etwaiges Auffinden in der Natur bzw. im Bilirubin möglich sein,



27.



28.



29.

denn ihre Rückverwandlung in das entsprechende Isobilirubin wird kaum Schwierigkeiten bereiten. Möglicherweise ist γ-Biliverdin (28) bereits in der Natur beobachtet worden, wenigstens schreiben H. WIELAND und A. TARTTER[1]) dem Pterobilin diese Konstitution zu. Allerdings ist Pterobilin in seiner spektroskopischen Erscheinung gegenüber Zinkacetat-Jod abweichend von Biliverdin IXα, jedoch könnte das eben durch die besondere „γ-Konstitutionsanordnung" bedingt sein, wenn auch auf Grund der bisherigen Untersuchung der Einfluß des Seitenkettensystems in der Gallenfarbstoffreihe wesentlich geringer ist als in der Porphyrinreihe[16]), [15]), vgl. aber [17]). Indessen steht eine systematische Untersuchung noch aus, insbesondere in bezug auf die Zinkacetat-Jodreaktion, bei der unter Umständen nicht unbeträchtliche Abweichungen zu konstatieren sind[16]), [6]) S. 210ff.].

Zum Schluß sei noch erwähnt, daß bereits seit einigen Jahren die synthetischen Gallenfarbstoffe an Zahl die in der Natur vorhandenen bei weitem übertreffen, und ihre Anzahl kann durch die Einführung der Vinylgruppe auf synthetischem Wege fast beliebig gesteigert werden, so daß auch alle biologischen und chemischen Fragen in der Gallenfarbstoffreihe auf breiter Grundlage bearbeitet werden können.

Literatur.

[1]) Liebigs Ann. **545**, 197 (1940). — [2]) A. VERZÁR, A. v. ARVAY, J. PETER u. H. SCHOLDERER, Biochem. Z. **257**, 133 (1933). — [3]) Liebigs Ann. **132**, 325 (1864). — [4]) H. FISCHER u. H. ORTH, Die Chemie des Pyrrols. **2** I, 621ff. (1937). — [5]) Naturwiss. **18**, 1026 (1930). — [6]) Eine ausgezeichnete Übersicht über Gallenfarbstoffe findet man in dem Artikel von W. SIEDEL in „Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe" **3**, 81—144 (1939). — [7]) H. FISCHER u. H. REINECKE, Hoppe-Seylers Z. **258**, 12 (1939). — [8]) H. FISCHER, H. PLIENINGER u. O. WEISSBARTH, Hoppe-Seylers Z. **268**, 197 (1941). — [9]) H. LICHTENWALD, Hoppe-Seylers Z. (im Druck). — [10]) H. PLIENINGER u. H. LICHTENWALD,

Hoppe-Seylers Z. (im Druck). — [11]) H. FISCHER u. E. HAARER, Hoppe-Seylers Z. **229**, 55 (1934); vgl. auch Hoppe-Seylers Z. **241**, 209 (1936). — [12]) H. FISCHER, H. LICHTENWALD u. H. REINECKE, Hoppe-Seylers Z. **257**, 193 (1939). — [13]) R. LEMBERG, Biochemic. J. **29**, 1322 (1935). — [14]) E. STIER, Hoppe-Seylers Z. **272**, 239 (1942). — [15]) E. STIER, Hoppe-Seylers Z. **273**, 58 (1942). — [16]) H. FISCHER u. H. REINECKE, Hoppe-Seylers Z. **259**, 88 (1939). — [17]) F. PRUCKNER u. A. STERN, Z. physik. Chem. (A) **180**, 25 (1937).

Adsorptionsanalyse von Gasen und Dämpfen*).

Von GERHARD HESSE und BENJAMIN TSCHACHOTIN, Marburg.

Die TSWETTsche Analyse (chromatographische Adsorptionsanalyse) ist trotz der außerordentlichen Erfolge, die sie bei der Trennung größerer Molekeln gebracht hat, auf leichtflüchtige Stoffe mit kleinen Molekulargewichten noch kaum angewandt worden. Die Grenze kann man etwa bei einem Molekulargewicht von 200 ansetzen. Wenn die Trennung leichterer Stoffe doch einmal versucht wurde, zeigte es sich gewöhnlich, daß eine ausreichende Adsorption aus den gebräuchlichen Lösungsmitteln gar nicht zustande kommt. Der Grund hierfür ist die Eigenadsorption der Lösungsmittelmolekeln; diese verdrängen die Analysensubstanz von der Oberfläche des Adsorbens und treten somit als Konkurrenten auf. Gewöhnlich muß das Lösungsmittel in derartig großem Überschuß verwendet werden, daß eine wirksame Verdrängung selbst dann noch stattfindet, wenn die Adsorbierbarkeiten von der gleichen Größenordnung sind.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der adsorptiven Trennung niedrigmolekularer Substanzen. Lösungsmittel mit noch wesentlich geringerer Affinität zum Absorbens, verglichen mit den in Frage stehenden Stoffen, finden sich unter den Gasen. Durch ihre Anwendung wird die chromatographische Adsorptionsanalyse zwangsläufig aus der flüssigen Phase in die gasförmige verlegt.

Das Verfahren gestaltet sich dann folgendermaßen: Das Gemisch wird verdampft und mit einem Trägergas, das das Lösungsmittel vertritt, durch ein mit dem Adsorptionsmittel angefülltes Rohr geleitet, wo es sich chromatographisch trennt. Notwendigerweise muß das Adsorptionsrohr geheizt werden, damit die Kondensation darin vermieden wird. Der übergehende Dampf wird in einem Kühler verflüssigt und in Ausfriertaschen vollständig ausgeschieden. Die Fraktionen müssen dann zur Beurteilung der erfolgten Trennung einer quantitativen Untersuchung unterzogen werden. Da die Arbeitsweise einer Destillation ähnelt, sprechen wir im folgenden auch von „Adsorptionsdestillation".

Vor allem 2 Aufgaben sind es, die wir mit der so erweiterten Adsorptionsmethode lösen wollen, weil die fraktionierte Destillation dabei versagt. Erstens handelt es sich um die *Trennung gleichsiedender Stoffe*, die wir an den binären Gemischen Benzol—Cyclohexan und Benzol—Cyclohexen sowie Isopropylalkohol—Tertiärbutylalkohol eingehend untersucht haben. Bei den beiden erstgenannten versagt sogar die Trennrohrmethode von CLUSIUS und DICKEL[1]), da außer dem Siedepunkt auch das Molekulargewicht und die übrigen

[1]) Vgl. H. KORSCHING u. K. WIRTZ, Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 249 (1940).

* Aus dem Chemischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn. — Diplomarbeit Marburg 1940.

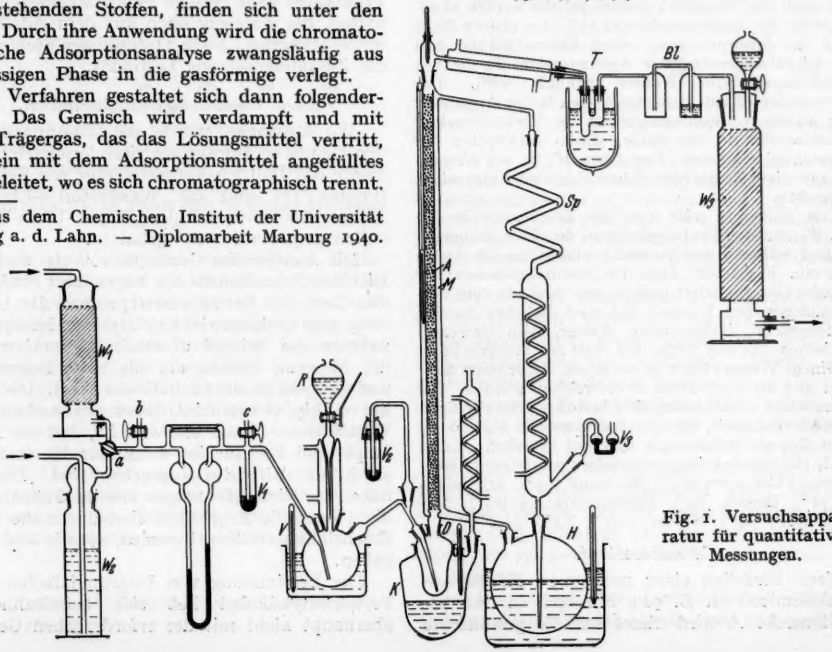


Fig. 1. Versuchsapparatur für quantitative Messungen.

Molekeleigenschaften zu wenig verschieden sind. Hier soll daran erinnert werden, daß Fraktionen gleich siedender Stoffe sehr häufig bei der Destillation komplizierter Gemische (Steinkohlenteer, Säuren aus natürlichen Fetten, Aminosäureester) als Endprodukt erhalten werden. In diesem Fall können die Komponenten chemisch recht verschieden sein, und daher bieten solche Gemische die beste Aussicht auf Erfolg. In der Tat hat sich das Verfahren zum erstenmal an einem derartigen Problem praktisch bewährt (S. 390).

Zu den Stoffen, die sich im Siedepunkt nur wenig unterscheiden, gehören auch die *Stereoisomeren* cis- und trans-Dichloräthylen. Auch hier ist eine Trennung weitgehend möglich.

Die zweite Aufgabe erstrebt die Scheidung *konstant siedender Gemische* mit Siedepunktsminimum oder -maximum. Dies Problem konnten wir am Beispiel Benzol—Cyclohexan erfolgreich lösen. Bei der adsorptionsanalytischen Trennung war das Minimumgemisch mit 5,7 % Benzol in keiner Weise bevorzugt, und es wurde von jeder der beiden Komponenten ein großer Teil in optisch reiner Form isoliert.

Apparatur. Den Hauptteil der Versuchsapparatur (Fig. 1) bildet ein senkrecht stehendes Glasrohr *A* von 66 cm Länge und 1,55 cm innerem Durchmesser, das das Adsorptionsmittel aufnimmt. Es ist von einem Heizmantel *M* umgeben, der von dem Dampf einer in *H* siedenden Flüssigkeit durchströmt wird; die Spirale *Sp* gibt dem System die notwendige Elastizität. Das Ventil V_3 ermöglicht den Druckausgleich. Das Adsorptionsrohr *A* sitzt auf dem Destillierkölbchen *D* (150 ccm), das ebenfalls konstant beheizt werden kann; es nimmt die Analysensubstanz auf. Am oberen Ende trägt das Adsorptionsrohr einen kurzen Kühler und eine leicht auswechselbare Ausfriertasche *T*, die mit Kohlensäureeis-Äther-Gemisch gekühlt wird. Der Blasenzähler *Bl* läßt Undichtigkeiten in der Apparatur oder andere Unregelmäßigkeiten im Versuchsverlauf (Kondensation in der Säule, starke Adsorption des Trägergases) erkennen. Der Turm W_3 ist zur Absorption agressiver Trägergase (Schwefeldioxyd, Ammoniak) vorgesehen.

Das Trägergas tritt über die Trockenstrecke W_1 bzw. W_2 und den Dreiwegehahn *a*, der einen bequemen Wechsel während des Versuchs erlaubt, in die Apparatur ein. Es passiert dann den Strömungsmesser, der für jedes Gas gesondert geeicht sein muß. In dem Verdampfungskolben *V* lassen sich nach Belieben flüssige Elutionsmittel, insbesondere Wasser, dem Gasstrom beimischen. Es war nötig, den Hals des Tropftrichters mit einem Wasserkühler zu umgeben, da er sonst leerkocht und die Gase durch *R* entweichen würden. Die Hähne *b* und *c* erleichtern die Einstellung der richtigen Gasgeschwindigkeit, die Quecksilberventile V_1 und V_2 haben sich als Sicherungen sehr gut bewährt.

Als Heizflüssigkeiten verwandten wir folgende Substanzen: Chloroform (61°), Methanol (65°), Äthylalkohol (78°), Benzol (80°), Isopropylalkohol (83°), Trichloräthylen (86°), Wasser (100°), Xylol (140°).

Versuchsverlauf.

Nach Einfüllen einer gewogenen Menge Adsorptionsmittel (z. B. 90 g Silicagel) in das Adsorptionsrohr *A* wird dieses auf die gewünschte Temperatur (83°) gebracht. Gleichzeitig wird die ganze Apparatur mit dem ersten Trägergas (Stickstoff) durchgespült. Hierauf wird in *D* bei abgenommenem Ventil V_2 eine abgewogene Menge (etwa 20 g) des zu trennenden Gemisches eingefüllt und nach Aufsetzen des Ventils der Gasstrom auf die gewünschte Geschwindigkeit einreguliert; hierauf wird Hahn *c* geöffnet und die Heizflüssigkeit in *K* (86°) zu lebhaftem Sieden erhitzt. Sobald dies erreicht ist, wird Hahn *c* geschlossen (Versuchsbeginn).

In unseren systematischen Versuchen wurde die Vorlage *T* jedesmal gewechselt, wenn etwa 1 ccm Kondensat darin angesammelt war; dabei wurden alle Daten (Zeit, Temperaturen, Gasgeschwindigkeit) notiert. Wenn die Destillationsgeschwindigkeit stark nachläßt, kann man entweder noch zu einem anderen Trägergas übergehen, das eine teilweise Elution bewirkt, oder man eluiert gleich vollständig mit einem stark adsorbierbaren Gas (NH_3) oder einer in *V* verdampften Flüssigkeit (Wasser). Die Dauer eines solchen Versuchs betrug etwa 8 Stunden, und es wurden im Durchschnitt 92 Mol-%, in günstigen Fällen über 99 Mol-% der eingesetzten Substanzen wiedergefunden. Auch durch Erhöhung der Säulentemperatur (140°) kann der Versuch zu Ende gebracht werden.

Die gefüllten Vorlagen wurden nach Temperaturausgleich genau gewogen und mit einem passenden Trockenmittel versetzt (meist Natriumstückchen). Es hat sich nämlich gezeigt, daß sämtliche Fraktionen ganz geringe Feuchtigkeitsspuren enthalten, die wahrscheinlich aus dem Adsorptionsmittel stammen. Nach 24stündigem Stehen wurde die Zusammensetzung bestimmt.

Die angewandten Meßmethoden.

Wo angängig, wurde die Zusammensetzung der Gemische refraktometrisch ermittelt; hierzu diente das Pulfrich-Refraktometer von Zeiß, Jena (Prisma 1c) und die Wasserstoff-α-Linie; die Temperatur wurde mit dem Höpler-Ultra-Thermostaten genau auf 20,0° gehalten.

Die Analyse der Gemische von cis- und trans-Dichloräthylen konnte nur angenähert erfolgen, da das Glas des Refraktometerprismas die Umlagerung zum Gleichgewicht katalysiert; infolgedessen nahmen die Winkel oberhalb 46° 28′ während der Messung ständig ab, die tiefer liegenden zu und strebten so alle nach diesem Wert. Die Trennkurve (Fig. 5) erscheint daher ungünstiger als in Wirklichkeit. Bemerkenswert ist, daß wir für Anfangs- und Endfraktion extremere Werte fanden, als in der Literatur angegeben sind. Entweder haben für diese Messungen unreine Präparate gedient oder die Ergebnisse sind durch die gleiche Erscheinung verfälscht worden, die wir beobachtet haben.

Die Bestimmung von Isopropylalkohol neben Tertiärbutylalkohol ließ sich refraktometrisch überhaupt nicht mit der erforderlichen Genauig-

keit durchführen, da die Brechungsexponenten zu nahe beieinander liegen. Hier wurde deshalb eine chemische Methode entwickelt, die auf der Oxydation des Isopropylalkohols mit Chromsäure in saurer Lösung beruht. Die unverbrauchte Chromsäure wurde jodometrisch zurücktitriert. Unter genau festgelegten, empirisch ermittelten Bedingungen ließ sich eine Genauigkeit von durchschnittlich 1% erreichen, die als ausreichend angesehen wurde.

Trennungen.

1. Benzol—Cyclohexan. Diese beiden Stoffe mit den Siedepunkten 79,5° für Benzol und 80,0° für Cyclohexan sind durch fraktionierte Destillation nicht zu trennen, zumal sie ein bei 77,5° konstant siedendes Gemisch mit 5,7% Benzol geben[1]). An Silicagel erhielten wir das Trennungsbild der Fig. 2; die Versuchsbedingungen sind in der Unterschrift angegeben.

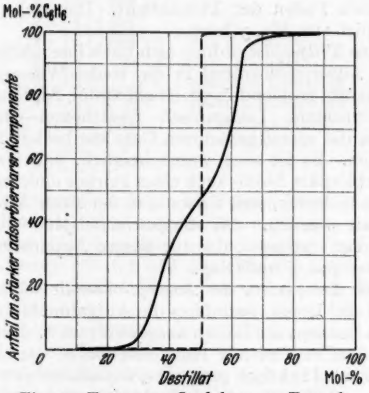


Fig. 2. Trennung Cyclohexan—Benzol.
16,7 g Gemisch 1 : 1, 90 g Silicagel (Deutsche Silicagel-Ges., Berlin), Trägergase N_2, CO_2, Elution mit Wasser, Gasgeschwindigkeit 1,26 Liter/Stunde.
Die gestrichelte Kurve würde sich bei idealer Trennung ergeben.

Danach sind 52% des vorhandenen Cyclohexans mit weniger als 1% Benzol und 45% des Benzols in gleichem Reinheitsgrad erhalten worden; Anfangs- und Endfraktion waren optisch rein. Die Unregelmäßigkeit im Verlauf der Kurve rührt vom Wechsel des Trägergases her.

2. Benzol—Cyclohexen. Diese beiden Kohlenwasserstoffe unterscheiden sich im Siedepunkt um 3° und zeigen daher bei der fraktionierten Destillation eine gewisse Anreicherung des Benzols in den ersten Fraktionen. So erhielten wir mit einer Glasperlenfüllung in unserer Apparatur, in die zur Erzeugung des Rückläufs ein kleiner Dephlegmator eingesetzt war, das Bild der Kurve 1, Fig. 3.

[1]) S. YOUNG, Distillation Principles and Processes. London 1922.

Es war nicht ganz sicher vorauszusehen, wie sich das Gemisch bei der Adsorptionsdestillation verhalten würde. Da der Benzolring sowohl nach dem Inkrement der Verbrennungswärmen als auch in seinem Verhalten als Chromophor bei Diphenylpolyenen etwa anderthalb Doppelbindungen entspricht, haben wir erwartet, daß Cyclohexan trotz des höheren Siedepunktes zuerst übergehen würde. Das ist, wie Kurve 2 zeigt, in der Tat der Fall. Der Vergleich der beiden Kurven gibt ein anschauliches Bild von der Leistung des Adsorptionsmittels.

Immerhin ist diese Trennung äußerst schwierig durchzuführen und lieferte uns zunächst keine reinen Stoffe. Solche erhielten wir erst, als die Menge des Adsorptionsmittels im Vergleich zur Menge der Analysensubstanz ganz erheblich erhöht wurde; in diesem Fall konnten 25% des Cyclohexens optisch rein abgetrennt werden (Kurve 3).

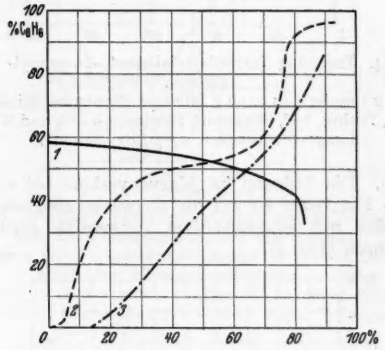


Fig. 3. Trennung Cyclohexen—Benzol (1 : 1).
Kurve 1 (———): Glaskugeln, 83°, Dephlegmator. 16,9 g Gemisch.
Kurve 2 (- - - -): 90 g Blaugel (Gebr. Herrmann, Köln-Bayenthal 263), 100°, Stickstoff, Elution mit Wasser, Gasgeschwindigkeit 1,26 Liter/Stunde, 16,9 g Gemisch.
Kurve 3 (— · —): 90 g Silicagel (Deutsche Silicagel-Ges., Berlin), 83°, später 100°, Elution bei 140°, Stickstoff, Gasgeschwindigkeit 1,00 Liter/Stunde, 5,9 g Gemisch.

Wegen seiner schwierigen Trennbarkeit haben wir das Gemisch Cyclohexen—Benzol benutzt, die Abhängigkeit der Trennwirkung von den Versuchsbedingungen zu studieren. Davon wird später noch die Rede sein (S. 390).

3. Benzol—Tetrachlorkohlenstoff. Das Gemisch aus Benzol (Sp. = 79,5°) und Tetrachlorkohlenstoff (76,7°) war an Kieselsäuregel leicht zu trennen, zumal die flüchtigere Komponente CCl_4 hier auch schlechter adsorbiert wird. Bei dem einzigen Versuch, den wir gemacht haben (25,0 g an 90 g Gel), gelang es, 32% des Tetrachlorkohlenstoffs und auch einen Teil des Benzols optisch rein zu isolieren.

4. Isopropylalkohol–Tertiärbutylalkohol. Diese beiden Alkohole, die beide bei 82,9° sieden,

sind schwierig zu trennen. Der Isopropylalkohol wird stärker adsorbiert, wahrscheinlich aus sterischen Gründen. Reine Komponenten haben wir nicht gefaßt, doch dürfte sich dies durch Erhöhung der Adsorbensmenge erreichen lassen. Die Verluste sind bei dieser Trennung verhältnismäßig

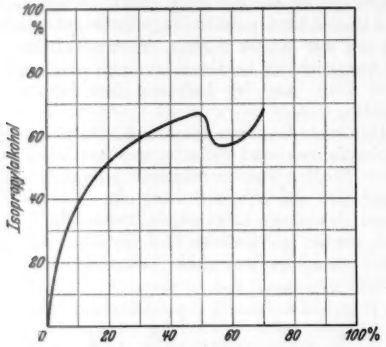


Fig. 4. Trennung Tertiärbutylalkohol—Isopropylalkohol.
24,4 g Gemisch 1 : 1, 90 g Silicagel (Deutsche Silicagel-Ges., Berlin), 83°, Stickstoff, Elution mit CO_2 und NH_3, Gasgeschwindigkeit 0,87 Liter/Stunde.

hoch. Die Störung im Kurvenverlauf bei etwa 50% Durchsatz ist auf die unzweckmäßig starke Elution mit unverdünntem Ammoniak zurückzuführen (Fig. 4).

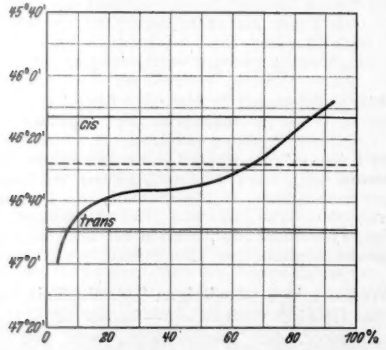


Fig. 5. Trennung cis- und trans-Dichloräthylen.
25,4 g Gemisch, 90 g Silicagel (Deutsche Silicagel-Ges., Berlin), 83°, Stickstoff, Elution mit Methanol, Gasgeschwindigkeit 1,0 Liter/Stunde.

5. Cis- und trans-Dichloräthylen. Schließlich versuchten wir ein zwischen 50 und 60° frisch destilliertes cis-trans-Gemisch von Dichloräthylen (25,4 g) am Silicagel (90 g) zu trennen. Das Ergebnis (Fig. 5) können wir allerdings nicht quantitativ auswerten, da die Refraktionswerte der reinen Komponenten nicht bekannt sind. Die für diese angegebenen Werte der Literatur haben wir auf beiden Seiten überschritten; sie sind zur Orientierung mit in das Diagramm eingetragen.

Der Einfluß der Versuchsbedingungen.

Die nachfolgenden Angaben stützen sich auf insgesamt 47 Trennungen, die wir unter den verschiedensten Bedingungen meist mit dem Gemisch Cyclohexen—Benzol durchgeführt haben.

Als *Adsorptionsmittel* haben wir verschiedene Sorten Kieselsäuregel und Aktivkohle probiert. Stets erwies sich das Gel überlegen. Am günstigsten waren bei unseren Versuchen das Standard-Silicagel der Deutschen Silicagel-Ges. Dr.v. Lude, Berlin, und das als Trockenmittel gedachte Blaugel von Gebr. Herrmann, Köln-Bayenthal 263. Der günstigste Korndurchmesser war 1—2 mm. Alle Adsorptionsmittel wurden vor dem Versuch bei 220° im scharf getrockneten Luftstrom entwässert.

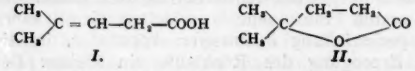
Mit zunehmender *Menge* des Adsorbens steigt in allen Fällen der Trenneffekt. Dies geht zum Beispiel aus Fig. 3 hervor.

Die *Trägergase* ordnen sich nach ihrer Affinität zum Adsorptionsmittel in die Reihe Wasserstoff, Stickstoff, Kohlendioxyd, Stickoxydul, Ammoniak. Bei unserem Testgemisch Cyclohexen—Benzol gaben die zuerst genannten Gase die besten Trennungen. Es ist aber wahrscheinlich, daß stärker adsorbierbare Stoffe auch eines stärker eluierenden Gases bedürfen, weil sie sonst in der Säule hängenbleiben würden. *Die Gasgeschwindigkeit* durchläuft ein Optimum, das für unsere Apparatur bei 1 Liter pro Stunde lag.

Die *Temperatur der Adsorptionssäule* soll möglichst tief liegen, weil dann die Aufnahmefähigkeit des Adsorbens am besten ausgenutzt wird. Keinesfalls darf es aber zur Kondensation in der Säule kommen. Praktisch genügt es, die Säulentemperatur 3—5° über dem Siedepunkt der schwerstflüchtigen Komponente zu halten. Um den Durchsatz zu beschleunigen, kann man an Stelle eines stärker konkurrierenden Trägergases auch eine höhere Arbeitstemperatur wählen. Sogar zur *Elution* haben wir die Temperaturerhöhung mit Erfolg verwendet (Fig. 3, Kurve 3).

Die praktische Anwendung.

Die erste präparative Anwendung[1]) der „Adsorptionsdestillation" liegt zeitlich noch vor den geschilderten eingehenden Untersuchungen. Sie ermöglichte die Abtrennung der ungesättigten Brenzterebinsäure (I) von den begleitenden Fettsäuren der Valerian- und Capronsäurereihe und dem ebenfalls gesättigten Lakton II.



In mehreren fraktionierten Destillationen hatte sich diese Zerlegung nicht durchführen lassen; das

[1]) Dissert. H. EILBRACHT, Marburg 1939 (D 4). — G. HESSE, H. EILBRACHT u. F. REICHENEDER, Liebigs Ann. **546**, 251 (1941).

Ergebnis war lediglich eine Fraktion gewesen, die bei 12 mm Druck zwischen 100 und 104° stetig überging.

Als Apparatur verwandten wir in diesem Fall einfach einen Claisenkolben, dessen Zweigrohr verlängert und mit einem Heizmantel umgeben war (Fig. 6). Am unteren Ende des Zweigrohrs war die Glaswand an 3 Stellen nach innen gedrückt, wodurch Stützen für eine kleine Siebplatte aus Porzellan erhalten wurden; auf diese kam die Füllung von Silicagel. Die Heizung geschah mit Wasserdampf.

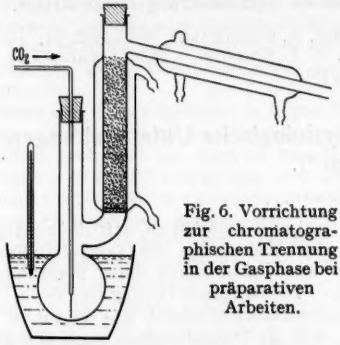


Fig. 6. Vorrichtung zur chromatographischen Trennung in der Gasphase bei präparativen Arbeiten.

Die Trennung erfolgte im Vakuum von 12 mm. Nachdem die Säule aufgeheizt war, wurde durch die weite Siedekapillare ein schwacher Kohlendioxydstrom geleitet und das Ölbad geheizt. Die gesättigten Anteile gingen schon bei einer Badtemperatur von 120—140° rasch über. Als die Destillation nachließ, wurde der Gasstrom verstärkt. Trotzdem war eine Temperatur von 200 bis 220° im Bad erforderlich, um auch die ungesättigte Brenzterebinsäure überzutreiben.

Nach Wiederholung der „Adsorptionsdestillation" bei 0,1 mm Druck war die Substanz fast rein (titriert 113,6 statt 114,1) und gab anstandslos ein kristallisiertes Bromaddukt.

Frühere Versuche zum gleichen Problem.

Schon im Jahre 1928 haben GRIMM und Mitarbeiter[1]) über die Trennung konstant siedender Flüssigkeitsgemische mit Hilfe von Adsorptionsmitteln berichtet. Unter verschiedenen Anwendungsarten versuchten sie auch die Destillation durch eine Adsorptionssäule, jedoch ohne Trägergas. Sie mußten dabei feststellen, daß der Erfolg nur gering war und die Filtration der flüssigen Gemische durch das Adsorbens wesentlich bessere Ergebnisse bringt. Zum Vergleich dieses Verfahrens mit dem unsrigen sind in Fig. 7 außer den experimentell ermittelten Trennkurven auch die Kurven bei idealer Trennung bzw. ohne Trennung für beide Gemische eingezeichnet:

[1]) H. G. GRIMM u. H. WOLFF, Z. angew. Chem. 41, 98 (1928). — H. G. GRIMM, W. RAUDENBUSCH u. H. WOLFF, Z. angew. Chem. 41, 104 (1928).

Obwohl verschiedene Gemische analysiert wurden, erkennt man leicht, daß mit unserer Methode eine noch wesentlich bessere Scheidung erreicht wird. Das liegt zum Teil an der verhältnismäßig größeren Menge Adsorptionsmittel, die wir anwenden können; beim Filtrierverfahren würde in diesem Fall nichts mehr abfließen. Den wesentlichen Unterschied sehen wir aber doch in der Anwendung des Trägerstoffes, der die zu trennenden Molekeln in einer bestimmten Richtung durch die Säule treibt. Auf dieser Wanderung werden sie vielfach adsorbiert und wieder abgelöst werden;

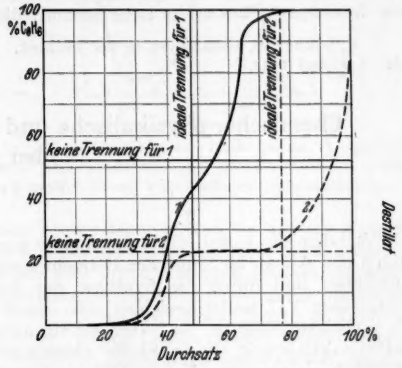


Fig. 7. Vergleich der chromatographischen Trennung mit der Filtrationsmethode von GRIMM.
Kurve 1 (—): Cyclohexan—Benzol 1 : 1, mit Stickstoff über Kieselgel getrieben.
Kurve 2 (----): Cyclohexan—Benzol 3 : 1, durch Kieselgel filtriert (Daten aus der Dissert. BOLZ. Würzburg).

es entwickelt sich also ein „Hindernisrennen" der Molekeln, wobei die adsorbierenden Stellen der Rohrfüllung die Hindernisse sind. Ein stärker adsorbierbarer Stoff wird häufiger und auch länger festgehalten werden als ein schlecht adsorbierbarer; er bleibt also mehr und mehr zurück. Gleiche Molekeln werden im Durchschnitt gleich stark aufgehalten und bleiben deshalb in Zonen beisammen. Die vielfache Wiederholung der auswählenden Vorgänge Adsorption und Elution verwischt alles Zufällige und macht auch die geringsten Unterschiede auf die Dauer noch zur Trennung geeignet.

Man hat versucht, diese Unterschiede im Adsorptionsverhalten zahlenmäßig zu fassen und diese Zahlen zu Voraussagen über Aussichten und Ausmaß der Trennung zu verwerten. GRIMM[1]) benutzt dazu die Benetzungswärmen. Wir haben die Höchstmengen der reinen Stoffe bestimmt, die das Adsorbens bei der Versuchstemperatur aufnimmt, ausgedrückt in Mol pro Gramm. Die Anordnung nach steigenden Kennziffern ergibt bei den untersuchten Flüssigkeiten in beiden Fällen die gleiche Reihenfolge zunehmender Adsorbierbarkeit, und stets geht der weniger adsorbierbare

[1]) Loc. cit.

Stoff bei der Trennung vor dem anderen über. Quantitativ stimmen die Ergebnisse jedoch nicht überein, und es ist daher durchaus möglich, daß umfassendere Messungen auch qualitativ Ausnahmen beibringen werden. Übrigens können nach unserer Ansicht statische Messungen schon deshalb kein richtiges Bild für den analytischen Vorgang geben, weil bei ihm die *Geschwindigkeit der Adsorption* eine große Rolle spielen muß; sterische Faktoren dürften mindestens ebenso mitsprechen wie energetische.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß unserem Verfahren eine etwas ältere gasanalytische Methode von SCHUFTAN[1]) besonders nahe kommt, die zur Bestimmung niederer Kohlenwasserstoffe in Erdgasen dient. Hierzu wird das Gemisch an Kohle adsorbiert und anschließend im Kohlendioxydstrom langsam eluiert; die Fraktionen, deren Durchbruch interferometrisch erkannt wird, werden getrennt über Lauge gesammelt.

Auch bei den Adsorptionsverfahren zur Gewinnung von Abgasen oder zur Abscheidung von Lösungsmitteldämpfen aus Luft[1]) treten zwangsläufig Trennungen auf, die jedoch meistens nicht ausgenutzt werden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

[1]) P. SCHUFTAN, Gasanalyse in der Technik. Leipzig: S. Hirzel 1931.

[1]) Vgl. A. ENGELHARDT, Kolloid-Z. **71**, 236 u. 335 (1935). — E. SCHINDEL, Chem. Apparatur **27**, 257 u. 273 (1940).

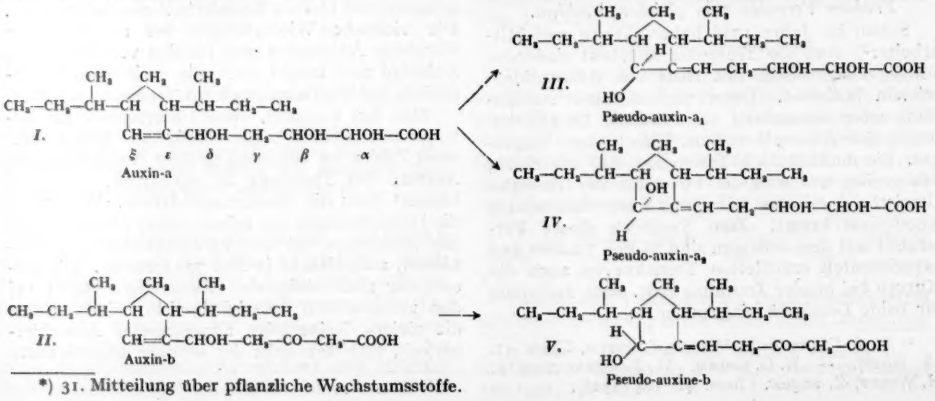
Chemische, physikalische und pflanzenphysiologische Untersuchungen über Lumi-auxon*).

Von FRITZ KÖGL, Utrecht.

I.

Nachdem die Konstitution der Auxine a und b durch den Abbau im Sinne der Formeln I und II aufgeklärt und durch die Synthese der Auxinglutarsäure VII weiter gesichert war, ergab sich als wichtigste Aufgabe, die Natur der eigenartigen Selbstinaktivierung dieser Stoffe chemisch verständlich zu machen. Bekanntlich verlieren die Auxine ihre Wirksamkeit im Laufe einiger Monate völlig, und zwar unabhängig davon, ob sie in Rohextrakten oder in kristallisiertem Zustande vorliegen. Die in Gemeinschaft mit Frl. Dr. ERXLEBEN und Dr. C. KONINGSBERGER ausgeführte Untersuchung (1) hat ergeben, daß die Selbstinaktivierung von Auxin-a zu einem Gemisch von zwei Stoffen führt, die wir Pseudo-auxin-a_1 und -a_2 genannt haben. Sie besitzen noch die Doppelbindung und die Carboxylgruppe, zeigen aber keine Mutarotation, wie sie bei den Auxinen durch die Einstellung eines Gleichgewichts mit dem entsprechenden δ-Lacton zustande kommt.

Wir nahmen zunächst an, daß die Inaktivierung durch eine Wanderung der Doppelbindung verursacht würde und waren daher überrascht, daß bei der Permanganat-Oxydation doch wieder Auxin-glutarsäure entstand, was darauf zu weisen schien, daß die Doppelbindung noch den gleichen Platz einnahm wie in Auxin-a selbst. Immerhin wußten wir nun mit Sicherheit, daß bei der Inaktivierung der der Auxin-glutarsäure entsprechende Molekülbezirk nicht betroffen wird. Auxin-b, das sich von -a nur durch die verschiedenartige Substitution an den C-Atomen α und β unterscheidet, wird beim Aufbewahren gleichfalls inaktiv. Als gemeinsamer Bezirk für die Umwandlung in die Pseudoreihe bleibt somit nur das Gebiet zwischen dem γ- und dem ξ-C-Atom, in welchem die Gruppierung eines Allylalkohols vorliegt. Es lag somit nahe, die Inaktivierung als Allylumlagerung aufzufassen und in der Tat lassen sich auf diese Weise drei Befunde zwanglos verstehen, die bei Annahme irgendeines anderen Reaktionsmechanismus



*) 31. Mitteilung über pflanzliche Wachstumsstoffe.

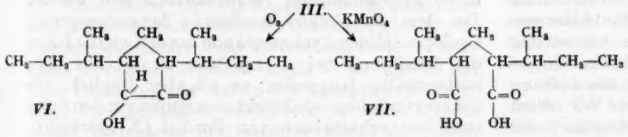
schwerlich auf einen gemeinsamen Nenner zu bringen wären:

1. Bei der Inaktivierung von Auxin-a entstehen zwei Isomere von sehr ähnlichen Eigenschaften, denen wir die stereoisomeren Formeln III und IV zuerteilen können.

2. Da die Pseudoauxine weder in der δ- noch in der γ-Stellung eine Hydroxylgruppe tragen, ist das Ausbleiben der Mutarotation ohne weiteres zu erklären.

3. Bei Auxin-a ist vor und nach der Inaktivierung keine Absorption im leicht zugänglichen Ultraviolett festzustellen; man kann jedoch auch bei Auxin-b, das das sehr charakteristische Spektrum einer β-Ketosäure besitzt, nach der Selbstinaktivierung keine Veränderung des Spektrums erkennen.

Waren alle diese Ergebnisse in bester Übereinstimmung mit unserer Arbeitshypothese, so konnte schließlich auch noch ein direkter Beweis für die Wanderung einer Hydroxylgruppe zum ξ-C-Atom erbracht werden. Beim Ozonabbau von Pseudoauxin-a_1 erhielten wir nämlich das Acyloin VI; nachträglich war es dann auch begreiflich, daß bei der Permanganat-Oxydation Auxin-glutarsäure VII entstand, die eine unveränderte Lage der Doppelbindung in den Pseudo-auxinen vortäuschte.



Auffällig bleibt nur der freiwillige und einseitige Verlauf der Allylumlagerung, der zur völligen Inaktivierung der beiden Auxine führt. Vermutlich spielen hierbei die Spannungsverhältnisse des Cyclopentenrings eine Rolle, doch liegen hierüber noch keine näheren Untersuchungen vor.

Auch Auxin-a-lacton (VIII) verliert in Lösung oder in Kristallform seine Wirksamkeit im Laufe einiger Monate vollkommen. Während jedoch die Selbstinaktivierung der Säuren verhältnismäßig rasch eine befriedigende Deutung fand, haben uns die Erscheinungen bei der Inaktivierung von Auxin-a-lacton vor mancherlei schwierig zu lösende Probleme gestellt. Die auf diesem Gebiete seit dem Jahre 1936 — mit einigen Unterbrechungen — ausgeführten Untersuchungen sind bisher nur in Dissertationen (2) niedergelegt bzw. in Vorträgen (3) diskutiert worden. Nachdem jedoch die vorliegenden Ergebnisse bereits als Ausgangspunkt für pflanzenphysiologische Arbeiten dienten, erscheint es angezeigt, den Stand der Dinge in einer Übersicht zu besprechen, obschon noch manches Rätsel ungelöst ist.

Wie schon erwähnt wurde, zeigt Auxin-a seiner Konstitution entsprechend keine Absorption im leicht zugänglichen Ultraviolett. Es war zu erwarten, daß dies auch für Auxin-a-lacton (VIII) gelten würde, da ja der Ringschluß zum inneren Ester kaum einen besonderen optischen Effekt verursachen dürfte. Überraschenderweise fanden wir jedoch bei Lösungen von Auxin-a-lacton stets ein äußerst charakteristisches Spektrum mit einem ausgeprägten Maximum bei 295 mμ (Fig. 1).

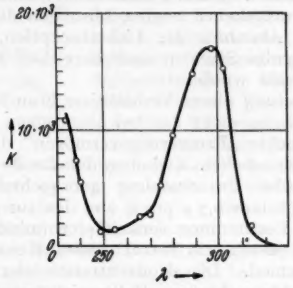


Fig. 1. *Absorptionskurve von Lumi-auxon.* Ausgezogen: Durch Selbstinaktivierung. Punkte: Durch Photoinaktivierung entstandenes Lumi-auxon.

Dieses Absorptionsspektrum ist mit der Konstitution von Auxin-a-lacton nicht zu vereinbaren. Da letztere aber durch Analysen, Molekulargewichtsbestimmungen, Derivate, sowie durch die wechselseitige Umwandlung von Auxin-a in das Lacton und die darauf beruhende Mutarotation einwandfrei feststeht, mußte das eigenartige Spektrum auf ein photochemisches Umwandlungsprodukt zurückzuführen sein. *In der Tat ergab die physiologische Auswertung, daß die verwendete Substanz ihre physiologische Wirksamkeit nach der lichtelektrischen Messung völlig verloren hat.* Im Gegensatz hierzu wird die Aktivität von Auxin-a und -b unter den gleichen Umständen in keiner Weise beeinflußt. Der nächste Schritt war die Feststellung, daß Kristallisate von Auxin-a-lacton, die einige Monate im Dunkeln aufbewahrt waren und dadurch ihre Wirksamkeit verloren hatten, genau das gleiche Absorptionsspektrum (Fig. 1) ergaben wie die zu Beginn der Messung aktiven Präparate. Die Reaktionsprodukte wurden später auch durch den Mischschmelzpunkt identifiziert. Das ultraviolette Licht hat also offensichtlich einen „katalytischen" Einfluß, so daß die Geschwindigkeit der Inaktivierung gegenüber jener der Dunkelreaktion außerordentlich erhöht wird. Wir haben die neue Verbindung zunächst „Lumi-auxin-a-lacton" genannt, möchten aber der Kürze halber künftig die Bezeichnung *Lumi-auxon* (-a) gebrauchen.

Bei der Bestimmung der optischen Drehung hatten wir gefunden, daß Auxin-a und sein Lacton mutarotieren, wobei von beiden Seiten aus nach einigen Stunden die gleiche Enddrehung erreicht wird; im Gleichgewichtszustand liegen (in Alkohol) etwa 60% Lacton und 40% Säure vor. Da eine Lösung von Auxin-a unter diesen Umständen alsbald auch Auxin-a-lacton enthalten müßte, sollte

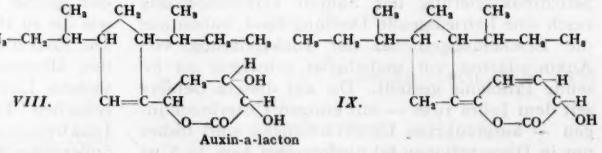
es logischerweise keinen prinzipiellen Unterschied bedeuten, ob man für die spektralanalytische Untersuchung von der Säure oder ihrem Lacton ausgeht. In Wirklichkeit gaben jedoch Lösungen von Auxin-a auch nach längerem Aufbewahren bei der lichtelektrischen Messung kein Lumi-auxon-Spektrum und umgekehrt zeigten Lösungen des Lactons keine Abnahme der Lichtabsorption, wenn diese erst einige Stunden nach Bereitung der Lösung gemessen wurde.

Zur Deutung dieser Verhältnisse braucht man glücklicherweise nicht das bei chemischen Reaktionen suspekte „Erinnerungsvermögen" der Lösungen heranzuholen. Zwischen den für die spektralanalytische Untersuchung gebrauchten Lösungen (höchstens 0,5 g pro l) und den zur polarimetrischen Bestimmung verwendeten (mindestens 80 g pro l) besteht ein beträchtlicher Konzentrationsunterschied. Die Konzentration der Ausgangsstoffe kann aber eine Rolle spielen, wenn die von der freien Oxysäure gelieferten Wasserstoffionen (4) einen „autokatalytischen" Einfluß auf die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung besitzen. Dieser Erklärungsversuch impliziert natürlich, daß in der konzentrierteren Lactonlösung nach kurzer Zeit bereits mehr H'-Ionen vorhanden sind als in der mindestens 160mal so verdünnten Lösung von Auxin-a. Mit anderen Worten muß es also einen Schwellenwert der H'-Ionenkonzentration geben, unterhalb dessen die Umsetzung Säure $\rightleftharpoons$ Lacton ausbleibt. Eine genaue Untersuchung über den p_H-Einfluß konnte aus äußeren Gründen noch nicht ausgeführt werden. Wir haben jedoch bereits festgestellt, daß nach Ansäuern der verdünnten Auxin-a-Lösung auf p_H 4,3 bei der lichtelektrischen Messung wirklich das Spektrum des Lumi-auxons erhalten wird. Noch überzeugender sind Versuche mit „konzentrierten" Lösungen von Auxin-a bzw. dessen Lacton, bei denen wir erst nach dem Erreichen der Enddrehung verdünnten und die spektralanalytische Untersuchung ausführten. In der Tat wurde dann nur der im Gleichgewicht als Lacton vorliegende Anteil (60%) durch das ultraviolette Licht in Lumi-auxon umgesetzt; dies läßt sich aus dem Absorptionskoeffizienten bei 297 mμ errechnen und ergibt sich ferner aus der unveränderten physiologischen Aktivität der restlichen 40% Auxin-a.

Während der Übergang von den Auxinen in die Pseudo-auxine eine Isomerisierung darstellt, wird bei der Umwandlung von Auxin-a-lacton in Lumi-auxon ($C_{18}H_{26}O_3$) ein Molekül H_2O abgespalten unter Bildung einer neuen Doppelbindung. Bei der katalytischen Hydrierung werden 2 Mol Wasserstoff aufgenommen, wobei ein neutral reagierendes Tetrahydroprodukt entsteht. Als weiteres Derivat des Lumi-auxons erhielten wir ein Semicarbazon, das im Gegensatz zum Ausgangsstoff sauer reagiert. Wir nahmen an, daß sich das Semicarbazon von einer Ketocarbonsäure ableitet, die durch Aufspaltung eines Enollactonrings entsteht. Bei der Mikro-Zerewitinoff-Bestimmung ergibt Lumi-auxon *ein* aktives H-Atom; das dritte Sauerstoffatom dürfte also in einer Hydroxylgruppe vorliegen.

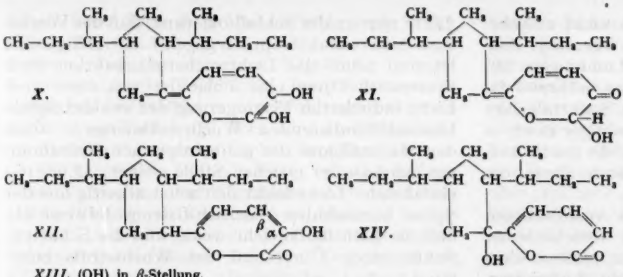
Beim Abbau mit Ozon liefert Lumi-auxon ein Ringketon $C_{13}H_{24}O$, das als kristallisiertes Nitrophenylhydrazon isoliert werden konnte. Es erwies sich als identisch mit dem Keton, das wir früher durch Oxydation von Dihydro-auxin-a mit Chromtrioxyd erhalten haben (VI, H statt OH). Hiermit ist erwiesen, daß auch bei der Photoinaktivierung die im Ausgangsstoff vorhandene Doppelbindung den Cyclopentan-Ring verlassen hat; die wesentlichen Veränderungen müssen sich außerhalb des C_{13}-Bezirks im Lactonring abspielen. Nimmt man an, daß auch im Lumi-auxon eine der Doppelbindungen semicyclisch ist und daß die zweite hierzu in Konjugation steht, so ergibt sich für Lumi-auxon Formel IX. Diese Formel vermag die oben genannten chemischen Befunde befriedigend zu erklären; man wird jedoch nicht erwarten, daß eine Verbindung dieser Konstitution eine charakteristische Absorptionsbande bei 295 mμ besitzt. Es schien möglich, daß für die langwellige Absorption die zu zwei Ringen semicyclische Stellung der einen Doppelbindung verantwortlich sein würde. Bei dem als Vergleichssubstanz herangezogenen Cyclopentyliden-cyclopentanon fanden wir die Lage des Maximums bei 265 mμ, also in der Tat verhältnismäßig langwellig; es ist aber fraglich, ob der zugrunde liegende Effekt zusammen mit den Substitutionsverhältnissen von Formel IX ausreicht, die Absorption von Lumi-auxon zu erklären.

Als weitere Möglichkeit haben wir eine Endiol-Struktur im Sinne von Formel X in Erwägung gezogen. Das zum Vergleich untersuchte Glutaconsäure-anhydrid, das in alkoholischer Lösung stark enolisiert ist, besitzt ein Maximum bei 335 mμ. Lumi-auxon gibt ferner im Gegensatz zu Glutaconsäure-anhydrid keine positive Eisenchlorid-Reaktion.



Es erhob sich die Frage, ob die im heterocyclischen Sechsring auftretenden Umwandlungen nicht auf andere Weise zu Strukturen mit *drei* konjugierten Doppelbindungen führen konnten.

Verbindung XI könnte aus IX — über X als Zwischenstufe — durch umgekehrte Ketisierung entstehen. Nach den Formeln XII, XIII und XIV wäre Lumi-auxon ein Derivat des α-Pyrons. Diese Formeln sind hinsichtlich des Absorptionsspektrums sehr bestechend, da wir für 4,6-Dimethyl-α-pyron und überraschenderweise auch für



XIII. (OH) in β-Stellung.

3-Oxy-α-pyron ebenfalls ein Maximum bei 295 mμ finden und auch kompliziertere α-Pyron-derivate (z. B. Scillaridin-a sowie die von H. WIELAND und Mitarbeitern untersuchten Krötengiftstoffe) bei dieser Wellenlänge eine sehr ähnliche Bande zeigen.

Die Bildung von XII und XIII aus Auxin-a-lacton wäre durch Verschiebung der Doppelbindung und Wasserabspaltung wenigstens formal unschwer zu verstehen. Gegen diese Formeln spricht jedoch wiederum die Tatsache, daß Lumi-auxon keine Eisenchloridreaktion zeigt; ferner sollte der Ozonabbau nicht zu einem Cyclopentanonderivat, sondern zu einer substituierten Cyclopentancarbonsäure führen. Bei Formel XIV wäre die Entstehung des C_{18}-Ringketons zu begreifen und auch der nichtenolische Charakter der Hydroxylgruppe erklärt; eine Verbindung dieser Formel kann jedoch aus Auxin-a-lacton — wenigstens auf dem Papier — nur durch eine komplizierte Folge von Umlagerungen abgeleitet werden. Trotz dieses Bedenkens und anderer Einwände halten wir Formel XIV bisher für den besten Ausdruck der Eigenschaften von Lumi-auxon.

Durch den Abbau des Tetrahydro-lumi-auxons mit Bleitetraacetat müßte sich z. B. zwischen IX und XIV unschwer eine Entscheidung treffen lassen. Wir haben jedoch seit längerer Zeit kein Lumi-auxon zur Verfügung, da die Reste unserer alten Präparate sich im Laufe einiger Jahre in bräunliche Pulver umwandelten — im Gegensatz zu den alten Kristallisaten der Pseudo-auxine, welche völlig farblos blieben. Leider sind wiederholte Versuche, im vergangenen Jahre aus Harn — wie das früher in unserem Laboratorium so häufig geschehen ist — Kristallisate aus Auxin-a zu isolieren, gescheitert. Die graphische Darstellung über den Zusammenhang von Fettnahrung und Auxin-Ausscheidung, welche im Jahre 1933 in dieser Zeitschrift (5) gegeben wurde, enthüllt den Grund für den kärglichen Auxingehalt des Kriegsharns . . . Vorläufig muß das Konstitutionsproblem des Lumi-auxons deshalb durch synthetische Arbeiten gefördert werden; auf diesem Gebiete hat J. BOLDINGH in unserem Laboratorium bereits wichtige Fortschritte erzielt.

II.

Welche Formel für Lumi-auxon später auch als richtig erkannt wird, man sieht heute schon, daß man es mit einer der merkwürdigsten photochemischen Umwandlungen zu tun hat. Die Bildung des Lumi-auxons stellt jedoch auch in *physikalischer* Hinsicht einen ganz ungewöhnlichen Vorgang dar. An und für sich ist es bereits bemerkenswert, daß die schwache Bestrahlung bei der lichtelektrischen Messung eine photochemische Umsetzung hervorruft. Während das Lacton bei mehrstündiger, monochromatischer Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 494 oder 436 mμ praktisch unverändert bleibt, wird es bei 405 mμ in etwa 15 Minuten, bei kürzeren Wellenlängen noch erheblich rascher inaktiviert. Das Absorptionsspektrum des Ausgangsstoffes ist demnach bei unseren Versuchsbedingungen nicht zu bestimmen; wie schon eingangs erwähnt wurde, dürfte Auxin-a-lacton aber in dem in Betracht kommenden Spektralbereich sicherlich keine spezifische Absorption besitzen.

Die rätselhafte Lichtreaktion war der Gegenstand einer Untersuchung, die Dr. G. J. SCHURINGA in unserem Institut ausgeführt hat und über die später an anderer Stelle eingehend zu berichten sein wird. Für die wertvolle Unterstützung, die uns bei diesen Problemen im Physikalischen Laboratorium der Rijksuniversiteit Utrecht zuteil wurde, sind wir den Herren Prof. Dr. L. S. ORNSTEIN, Dr. MILATZ und Dr. K. J. KELLER sehr zu Dank verpflichtet.

Da nur die absorbierte Energie photochemische Umsetzungen verursachen kann, scheinen die oben geschilderten Verhältnisse in völligem Widerspruch zur Theorie zu stehen. Man wird zunächst an die Möglichkeit denken, daß die für die Umwandlung erforderlichen Energiequanten von Spuren einer Verunreinigung absorbiert werden, die dann als Sensibilisator fungieren würde. In der Tat hat man bei Mengen von etwa 20 mg Auxin-a-lacton, die jeweils für die Versuche zur Verfügung standen, keine Gewähr dafür, daß sie trotz wiederholten Umkristallisierens und stimmender Analysen absolut rein sind. Bekanntlich ist die Erzielung eines absoluten Reinheitsgrades auch bei in beliebiger Menge zugänglichen Stoffen häufig keine geringe Aufgabe. Der vorliegende Fall läßt jedoch auch noch eine andere Hypothese zu, durch welche die Reinheit unseres Ausgangsstoffes nicht in Mißkredit zu kommen braucht. Die Inaktivierung von Auxin-a-lacton erfolgt — wohl durch die Wärmebewegungen der Moleküle — im Laufe einiger Monate auch im Dunkeln. Man muß daher annehmen, daß die reinen aktiven Präparate bald nach der Isolierung bereits Spuren von Lumi-auxon enthalten. Da die betreffenden Kristallisate bzw. Lösungen gewöhnlich erst nach einigen Tagen oder auch Wochen zur lichtelektrischen Messung kamen, könnte also Lumi-auxon sehr wohl als „Autosensi-

bilisator" fungieren. Es ist jedoch nicht unwahrscheinlich, daß diese Rolle durch irgendein Zwischenprodukt übernommen wird; Lumi-auxon absorbiert nämlich nur bis etwa 330 mμ, während die photochemische Reaktion auch im Spektralgebiet von 330 bis 405 mμ — wenn auch weniger rasch — erfolgt. Wir denken hierbei z. B. an die durch Aufspaltung des Lumi-auxons entstehende Säure, die bis etwas über 400 mμ absorbiert.

Nachdem bei den vorstehenden Ausführungen die photochemische Reaktion bei verschiedenen Wellenlängen verglichen worden war, mußten hierbei auch die jeweils verschiedenen Lichtintensitäten berücksichtigt werden. Zu diesem Zweck haben wir unsere Photozelle geeicht, wozu der POHLsche Doppelmonochromator, ein Quarzspektrograph und eine geeichte Bandlampe verwendet wurden. Ohne auf die experimentellen Einzelheiten einzugehen, mögen hier die wichtigsten Ergebnisse kurz in einer Tabelle angeführt werden:

Tabelle 1.

Photoinaktivierung von Auxin-a-lacton.

Wellenlänge in mμ	Bestrahlungsdauer in Sek.	Zugeführte Energie in Erg	Umsetzung in Lumi-auxon
334	600	11,4	99,6%
334	300	5,7	91,1%
334	60	1,14	73,0%
334	10	0,19	52,0%
365	1200	72,48	97,4%
365	600	36.24	80,2%
365	300	18,12	65,0%
365	120	7,25	35,0%
405	5400	744	99,8%
405	2700	372	93,2%
405	1800	254	79,0%
405	600	85	50,5%

Mit Licht von 313 mμ wurden bei einer orientierenden Messung durch 0,14 Erg bereits 80% des Auxin-a-lactons inaktiviert. Bei der Wellenlänge 436 mμ waren 1656 Erg, bei 494, 546 und 578 mμ Energiemengen bis über 10000 Erg nicht imstande, Mengen von Auxin-a-lacton zu inaktivieren, die im Avena-Test noch meßbar waren. *Auxin-a-lacton wird also durch sichtbares Licht nicht inaktiviert.*

Die experimentellen Daten ermöglichen die Berechnung der Anzahl Moleküle, die pro eingestrahltes Lichtquant inaktiviert werden; bei 334 mμ sind dies $3{,}1 \cdot 10^6$, bei 365 mμ $5{,}2 \cdot 10^4$ und bei 405 mμ $5{,}8 \cdot 10^3$ Moleküle. Berücksichtigt man noch, daß über den Anteil der absorbierten Quanten in unserem Fall keine Aussage gemacht werden kann, so muß man auf erstaunlich hohe Quantenausbeuten schließen. Wahrscheinlich handelt es sich bei der Photoinaktivierung des Auxin-a-lactons um eine Kettenreaktion.

III.

F. W. WENT (6) kam in seiner für die Auxinforschung grundlegenden Untersuchung aus dem Jahre 1927 zu der Schlußfolgerung, daß der Wuchsstoff der Avenakoleoptilen gegen Licht völlig stabil ist und „daß die Lichtwachstumsreaktion nach Spitzenbelichtung eine Folge ist von einer vom Licht induzierten Verringerung der aus der Spitze hinausdiffundierenden Wuchsstoffmenge". Über den Mechanismus der phototropischen Krümmungen wird an der gleichen Stelle gesagt: „Einseitig einfallendes Licht lenkt den sonst allseitig aus der Spitze kommenden Wuchsstoffstrom derweise ab, daß die Lichtflanke sehr wenig und die Schattenflanke einen Überschuß des Wuchsstoffs empfängt . . .".

Im Jahre 1933 stellte J. VAN OVERBEEK (7) bei Hypokotylen von Raphanus fest, daß positive phototropische Krümmungen nicht nur durch die ungleiche Verteilung des Wuchsstoffs zustande kommen, sondern daß dabei auch die größere Auxinempfindlichkeit der Schattenseite eine Rolle spielt. Drei Jahre später fand der gleiche Autor (8) an Avena, daß die Aktivität von Auxin-a bei Belichtung abnahm, jene von β-Indolyl-essigsäure jedoch ebenso groß blieb wie im Dunkelversuch. Zur Erklärung wurde eine oxydative Inaktivierung von Auxin-a angenommen.

Da wir in Auxin-a-lacton nur ein chemisch interessantes Derivat des eigentlichen Wuchsstoffs erblickten, wurden aus seiner Photoinaktivierung zunächst keine Konsequenzen gezogen. Im Jahre 1936 hat der Verfasser jedoch die Hypothese ausgesprochen (9), daß Auxin-a wahrscheinlich auch in der pflanzlichen Zelle im Gleichgewicht mit seinem Lacton stehen wird und somit die Wuchsstoffarmut der Lichtflanke — wenigstens zum Teil — auch durch die Bildung von Lumi-auxon zustande kommen könnte. Die in diesem Zusammenhang erforderlichen Arbeiten über die Bedeutung der Lumi-auxon-Bildung bei der Phototropie und der Lichtwachstumsreaktion der Pflanzen wurden unter der Leitung von Prof. Dr. V. J. KONINGSBERGER im Botanischen Laboratorium der Rijksuniversiteit Utrecht in Angriff genommen. In unserem Institut ist zunächst der Einfluß von Sensibilisatoren auf die Photoinaktivierung von Auxin-a-lacton untersucht worden.

Wenn es nicht möglich sein würde, Auxin-a-lacton durch Licht von längeren Wellenlängen als 405 mμ zu inaktivieren, wäre die physiologische Bedeutung der Lumi-auxon-Bildung von vorneherein sehr einzuschränken, da die phototropische Empfindlichkeit der Pflanze sich auf ein viel langwelligeres Gebiet erstreckt. Nun war bereits aus Arbeiten (10) von E. S. CASTLE (1931, 1935), J. BUDER (1932) sowie von G. WALD und H. G. DU BUY (1936) zu folgern, daß Carotinoide bei der Lichtempfindlichkeit der Pflanzen von ausschlaggebender Bedeutung sind. Ein Jahr später erschienen wichtige Veröffentlichungen von E. BÜNNING (11) über den Einfluß von Licht auf die Sporangienträger von Pilobolus Kleinii und Phycomyces Blakesleeanus. Es konnte mikrochemisch nachgewiesen werden, daß in den lichtempfindlichen

Zonen dieser Pilze β-Carotin auftritt; auch in der Koleoptilspitze von Avena wurde Carotin angetroffen. Auf Grund seiner Ergebnisse kommt E. BÜNNING zu der Folgerung: „Die phototropische Reizaufnahme besteht in der Strahlungsabsorption durch diesen Farbstoff", doch wird die Möglichkeit der Beteiligung anderer Farbstoffe offen gelassen.

Die genannten Befunde legten es nahe, bei unseren Versuchen über Sensibilisatoren der Lumiauxon-Bildung mit Zusätzen von β-Carotin zu beginnen. In der Tat fand Dr. G. J. SCHURINGA hierbei einen beträchtlichen Effekt; in Gegenwart von β-Carotin wird eine alkoholische Lösung von Auxin-a-lacton auch noch bei 578 mμ inaktiviert; am stärksten ist der Einfluß bei 436 mμ. Wir haben auch noch eine kolloidale wässerige Lösung

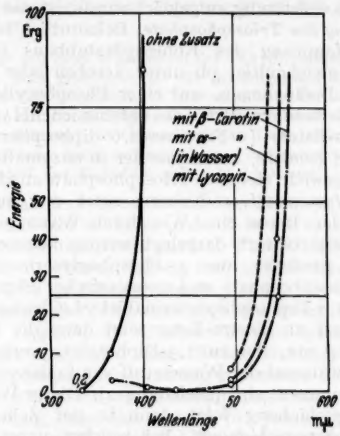


Fig. 2. *Photoinaktivierung von Auxin-a-lacton ohne und mit Zusatz von Carotinoiden.* Auf der Ordinate ist die Energie in Erg angegeben, welche erforderlich ist, um bei 0,5 ccm einer Lösung von Auxin-a-lacton (200 mg pro Liter) die Hälfte zu inaktivieren.

von α-Carotin sowie andere Carotinoide geprüft, die wir Prof. Dr. R. KUHN verdankten. Soweit wir aus unseren orientierenden Versuchen ersehen, haben die einzelnen Farbstoffe annähernd den gleichen Einfluß; dieser ist besonders im Spektralgebiet von 400 bis etwa 500 mμ sehr ausgeprägt (Fig. 2).

Den bisher besprochenen experimentellen Befunden, welche noch aus der Zeit vor dem Kriege stammen, schließt sich eine Untersuchung an, die kürzlich B. VERKAAIK (12) in unserem Laboratorium ausgeführt hat. Auxin-a ist bisher nur bei höheren Pflanzen angetroffen worden, während sich der im Avena-Test wirksame Stoff verschiedener Pilzarten als β-Indolylessigsäure (Heteroauxin) erwiesen hat. Wenn die oben genannten lichtempfindlichen Sporangienträger von Pilobolus und Phycomyces ebenfalls nur β-Indolyl-essigsäure enthielten, so könnte der im übrigen nun sehr plausiblen Beziehung zwischen β-Carotin, Auxin-a-lacton und Lichtwirkung keine universelle Bedeutung zukommen. Interessanterweise hat sich jedoch gezeigt, daß die im Avena-Test wirksamen Extrakte der jungen Sporangienträger von Phycomyces durch Kochen mit 5proz. Salzsäure 96—97% der Wirksamkeit verlieren; nach Zerstörung der β-Indolyl-essigsäure bleibt jedoch eine Restaktivität, die offensichtlich durch Auxin-a oder eine sehr nahe damit verwandte Verbindung verursacht wird. Dies ergibt sich außer der Säurebeständigkeit sowie der Zerstörung durch Alkali auch aus der Molekulargewichtsbestimmung (gef. 330); es wurde also die gleiche Methodik angewandt, welche früher zur Charakterisierung des Gräserwuchsstoffs von uns ausgearbeitet worden ist. Nicht unerwähnt soll bleiben, daß die Konzentration von Auxin-a in den Avenakoleoptilen und den Sporangienträgern von Phycomyces von derselben Größenordnung ist und daß in älteren, nicht mehr lichtempfindlichen Sporangienträgern nur β-Indolylessigsäure gefunden wurde.

Zum Schluß möge auf die einschlägigen Arbeiten aus dem Utrechter Botanischen Institut verwiesen werden, die von V. J. KONINGSBERGER (13) und B. VERKAAIK und von W. F. F. OPPENOORTH (14) veröffentlicht wurden. Die erstgenannten Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß „entsaatete" und dekapitierte Avenakoleoptilen wohl mit Auxin-a, nicht aber mit β-Indolyl-essigsäure phototropische Krümmungen geben. Diese Basisreaktion wird auf partielle Photoinaktivierung von Auxin-a-lacton zurückgeführt; für einen lateralen Transport im Sinne der CHOLODNY-WENTschen Theorie ergab sich bei der Koleoptilbasis kein Anhaltspunkt. OPPENOORTH kommt bei Studien an der intakten Avena-Koleoptile zu dem Ergebnis, daß Auxin beim Phototropismus in dreifacher Hinsicht beteiligt ist: Durch Photoinaktivierung von Auxin-a-lacton, durch vom Licht hervorgerufene Neubildung von Auxin und durch lateralen Transport.

Der vorliegende Bericht muß bei manchen chemischen, physikalischen und pflanzenphysiologischen Fragen die Antwort schuldig bleiben. Auf eine Frage, die man vor einigen Jahren gestellt hat, kann man jetzt eine Antwort geben. Der Außenseiter war geneigt, in einem Wuchsstoff ein Zauberagens zu sehen und mochte glauben, daß die Pflanze nicht genug des Guten haben könne. Warum dient dann nicht die der Pflanzenzelle leicht zugängliche β-Indolyl-essigsäure als Wuchsstoff an Stelle des komplizierten Auxin-a-Moleküls? Abgesehen davon, daß Hetero-auxin möglicherweise nur als Aktivator (15) des natürlichen Wuchsstoffs gelten darf, weisen die neuen Erkenntnisse mit Nachdruck darauf hin, daß die Hemmung für das sinngemäße Wachstum nicht weniger wichtig ist als die Förderung. In diesem Sinne ist die Konstruktion eines Wuchsstoffmoleküls, das durch eine einfache „Umschaltung" lichtempfindlich oder lichtbeständig gemacht werden kann, als eine der verblüffendsten „Erfindungen" der pflanzlichen Zelle zu betrachten.

Literatur.

1. Z. physiol. Chemie **244**, 266 (1936). — 2. Diss. C. KONINGSBERGER, Utrecht 1936 und Diss. G. J. SCHURINGA, Utrecht 1941. — 3. H. ERXLEBEN, Angew. Chem. **51**, 172 (1938). — 4. Vgl. hierzu die Verhältnisse bei der Laktonisierung von γ-Oxybuttersäure und γ-Oxy-valeriansäure. P. HENRY, Z. physik. Chem. **10**, 96 (1892). — 5. Naturwiss. **21**, 17 (1933). — 6. Diss. Utrecht 1927. — 7. Rec. trav. bot. néerl. **30**, 537 (1933). — 8. Proc. Nat. Acad. of Sc. **22**, 187 und 421 (1936). — 9. Vortrag an der Technischen Hochschule München am 5. XII. 1936. — 10. J. gen. Physiol. **14**, 701 (1931); Cold Spring Harb. Symposia **3**, 224 (1935); Beitr. Biol. Pflanzen **19**, 420 (1932); Science **84**, 247 (1936). — 11. Planta **26**, 719, **27**, 148 u. 583 (1937). — 12. Diss. Utrecht 1942. — 13. Rec. Trav. Bot. Néerl. **35**, 1 (1938); auf die Kritik, die diese Arbeit von anderer Seite gefunden hat, kann hier nicht eingegangen werden. — 14. Rec. Trav. Bot. Néerl. **38**, 287 (1941). — 15. H. v. GUTTENBERG, Naturw. **30**, 109 (1942).

Die Rolle der Phosphorsäure bei Dehydrierungsvorgängen und ihre biologische Bedeutung.

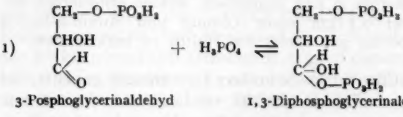
Von FEODOR LYNEN, München.

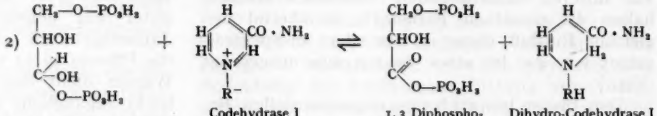
In den letzten dreißig Jahren hat sich das „Prinzip der Wasserstoffverschiebung", das von H. WIELAND[1]) im Jahre 1912 aufgefunden wurde, als absolut dominierend bei Atmung und Gärung erwiesen. Den Nahrungsstoffen wird durch spezifische Enzyme der *Wasserstoff* entzogen, der dann unter Zuhilfenahme zelleigener Überträger mit dem Sauerstoff der Luft zusammengebracht wird oder bei der Gärung auf Wasserstoffacceptoren übertragen wird, die im Zuge des Abbaus aus den Nahrungsstoffen entstanden sind. War somit die Frage nach dem Mechanismus, nach dem sich die energieliefernden Stoffwechselvorgänge abspielen, grundsätzlich entschieden, so blieb doch die Art und Weise, wie die Zelle diese Energie für ihre eigenen Zwecke nutzbar macht, abgesehen von einigen wenigen Ausnahmen, in Dunkel gehüllt. Aus der WIELANDschen Theorie konnte man zwar ohne weiteres ableiten, daß die lebende Zelle, um eine endotherme Dehydrierungsreaktion durchführen zu können, diese wahrscheinlich mit einer energieliefernden Hydrierungsreaktion koppeln wird, aber im großen und ganzen reichten diese Vorstellungen nicht aus, um das Problem der Energieübertragung und Energiespeicherung in der Zelle zu lösen.

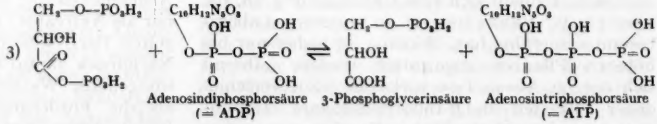
Es ist die neueste biochemische Forschung, die zur Klärung dieser Fragen ein gut Teil beigetragen hat, die vor allem deutlich gemacht hat, daß diesen Vorgängen ein stofflicher Mechanismus zugrunde liegt. Wie sich nämlich herausgestellt hat, verlaufen gewisse Dehydrierungsvorgänge unter Mitwirkung von *anorganischer Phosphorsäure*, die dabei in eine energiereichere Verbindung übergeführt wird. Von diesen Reaktionen und ihrer Bedeutung im Zellgeschehen soll im folgenden die Rede sein.

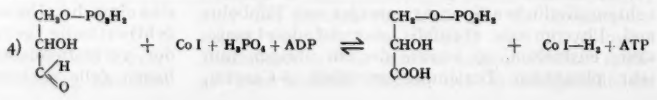
Die Dehydrierungsreaktionen.

Die erste dieser Reaktionen, die im Gegensatz zu den folgenden in ihrem Mechanismus vollständig aufgeklärt wurde, ist die *Dehydrierung des Triosephosphats*. Bekanntlich beginnt der Hauptweg des Kohlehydratabbaus in der Zelle, gleichgültig, ob unter aeroben oder anaeroben Bedingungen, mit einer Phosphorylierung, der sich dann der Zerfall des entstandenen HARDEN-YOUNG-Esters (= Fructose-1,6-diphosphorsäure) in zwei isomere, untereinander in enzymatischem Gleichgewicht stehende Triosephosphate anschließt. Die Wasserstoffverschiebung setzt erst auf der Stufe der Triose ein. Wie durch WARBURG und seine Mitarbeiter[2]) dargelegt werden konnte, entsteht zunächst aus 3-Phosphoglycerinaldehyd (= Triosephosphat) und anorganischer Phosphorsäure 1,3-Diphosphoglycerinaldehyd (Gleichung 1). Und erst an diesem Ester setzt dann die Dehydrierung ein, die zu 1,3-Diphosphoglycerinsäure führt, während der Wasserstoff von Codehydrase I aufgenommen wird (Gleichung 2). Dieser Wasserstoffverschiebung folgt dann in der Zelle eine *„Phosphatverschiebung"*, bei welcher unter Mitwirkung eines spezifischen Fermentes die anhydrid-









artig gebundene Phosphorsäure der 1,3-Diphosphoglycerinsäure auf Adenosindiphosphorsäure übertragen wird (Gleichung 3).

Durch Addition dieser Primärreaktionen, auf deren Umkehrbarkeit noch besonders hingewiesen sei, erhält man eine Bilanzgleichung (Gleichung 4), nach der es den Anschein hat, als ob die Dehydrierung des 3-Phosphoglycerinaldehyds zur 3-Phosphoglycerinsäure mit der Synthese von Adenosintriphosphorsäure (= ATP) aus Adenosindiphosphorsäure (= ADP) und anorganischer Phosphorsäure gekoppelt wäre. So ist es auch zu verstehen, daß schon lange bevor der genaue Mechanismus der Triosephosphatdehydrierung und ihrer Folgereaktion aufgeklärt worden war, diese eigenartige Koppelung zwischen Dehydrierung und Phosphorylierung das Augenmerk auf sich gezogen hatte[3–7]).

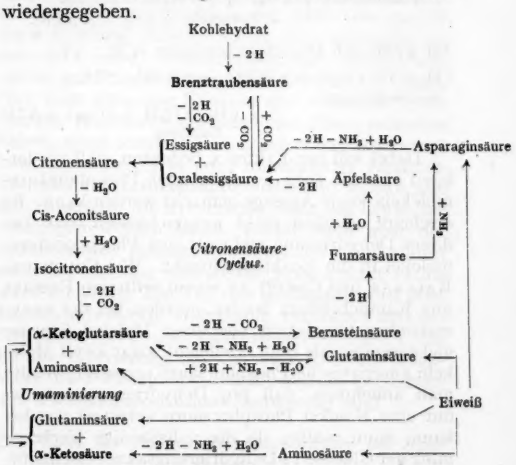
Was mit dem Wasserstoff der Dihydro-codehydrase in der Zelle geschieht, ist für die folgenden Betrachtungen ohne Bedeutung. Unter anaeroben Bedingungen wird er auf Acetaldehyd oder Brenztraubensäure übertragen (Gärung), in Gegenwart von Luft jedoch unter Vermittlung eines autoxydablen Fermentes mit dem Sauerstoff zur Reaktion gebracht (Atmung).

Etwas anderes ist es mit der Adenosintriphosphorsäure; ihr Schicksal in der Zelle soll später noch ausführlich behandelt werden. Vorerst mag es genügen, zu wissen, daß sie ihre endständige Phosphorsäure an Glucose abgeben kann, die dabei in ROBISON-Ester, und wenn noch eine zweite Molekel ATP reagiert, in HARDEN-YOUNG-Ester übergeführt wird. Auf diese Weise tritt die bei der Triosephosphatdehydrierung gebundene Phosphorsäure schließlich als Hexosediphosphorsäure in Erscheinung, wie dies bereits im Jahre 1905 von HARDEN und YOUNG[8]) bei der alkoholischen Gärung in zellfreien Hefesäften entdeckt worden ist.

Bei den anderen Dehydrierungsvorgängen sind unsre Kenntnisse leider bei weitem noch nicht so weit gediehen. Das Studium dieser Reaktionen geht auf Beobachtungen an der Muskulatur[9]) und am Herz[10]) des Frosches, an Erythrocyten der Vögel[11]), an verschiedenen Geweben der Säugetiere[12, 13]), an Milchsäurebakterien[14]) und an Hefe[15]) zurück, nach denen die Atmungsvorgänge, auch wenn die Dehydrierung des Triosephosphats ausgeschaltet ist, mit einer Phosphorylierung verknüpft sind. Die meisten dieser Untersuchungen erlaubten zwar nur die Feststellung, daß bei der Atmung in ihrer Gesamtheit anorganische Phosphorsäure verschwindet, aber in einigen davon, und vor allem in neueren Arbeiten, war es doch schon möglich, diese Koppelung von Dehydrierung und Phosphorylierung an bestimmten Gliedern der Reaktionskette zu lokalisieren. Erschwerend fällt dabei ins Gewicht, daß der genaue Weg des oxydativen Abbaus immer noch nicht in allen Einzelheiten bekannt ist. Das bisherige Versuchsmaterial läßt aber doch den verhältnismäßig sicheren Schluß zu, daß generell die *Dehydrierung der α-Ketosäuren* unter Mitwirkung von Phosphorsäure vor sich geht*). Für den wichtigsten Vertreter dieser Stoffklasse, die Brenztraubensäure, ist dies exakt bewiesen[14, 16]), für die anderen α-Ketosäuren sehr wahrscheinlich gemacht worden.

So konnte z. B. KALCKAR[17]) unter Verwendung eines Enzympräparates aus Niere beim oxydativen Abbau von Glutaminsäure oder Citronensäure eine Phosphorylierung nachweisen. Da beide Säuren bei der Dehydrierung in α-Ketoglutarsäure übergehen[18, 19]) (siehe Schema), erscheint es recht wahrscheinlich, daß erst bei deren weiterem Abbau die anorganische Phosphorsäure gebunden wird. Außerdem ist auch in der Giftwirkung der arsenigen Säure, welche in spezifischer Weise die Dehydrierung von α-Ketosäuren unterbindet[18, 20]), ein Anhaltspunkt dafür zu sehen, daß dieser Reaktion bei allen Ketosäuren wahrscheinlich ein und derselbe Mechanismus zugrunde liegt.

Die α-Ketosäuren nehmen im Stoffwechsel der Zelle eine zentrale Stellung ein. Bei der Verbrennung des Kohlehydrats treten Brenztraubensäure, und wenn man für den weiteren Abbau den KREBSschen Citronensäurecyclus[21]) als wahrscheinlich annehmen will**), auch α-Ketoglutarsäure als Zwischenprodukte auf. Auch der Abbau der Eiweißstoffe führt über die freien Aminosäuren zu den entsprechenden α-Ketosäuren. Dabei kann die Ketosäure aus der Aminosäure sowohl durch direkte Dehydrierung als auch durch Umaminierung mit α-Ketoglutarsäure oder Oxalessigsäure gebildet werden[22, 23]). In der folgenden Zusammenstellung sind diese Beziehungen nochmals schematisch wiedergegeben.



Der Mechanismus der Ketosäuredehydrierung ist vorderhand noch nicht in allen Einzelheiten klar.

*) Die Oxalessigsäure macht dabei eine Ausnahme, da sie nicht dehydriert wird, sondern einer Decarboxylierung unterliegt. Dies hängt wohl damit zusammen, daß es sich bei dieser Säure gleichzeitig um eine α- und β-Ketosäure handelt.

** In erster Linie sollen die Vorgänge in tierischen Geweben und in Hefe behandelt werden.

In carboxylasehaltigen Zellen, wie z. B. in Hefe, setzt die Dehydrierung sicher erst auf der Stufe des unter CO_2-Abspaltung aus der Ketosäure entstandenen Aldehyds ein[24, 25]). In tierischen Zellen und in Milchsäurebakterien hingegen soll die Dehydrierung an der Ketosäure selbst einsetzen und in einer einzigen Stufe direkt zu derselben nächst niederen Fettsäure führen[14, 26]), die auch auf dem Umweg über den Aldehyd erreicht wird. Allerdings hat sich vor kurzem herausgestellt, daß diese Zellarten, die man bisher als carboxylasefrei ansah, doch eine Carboxylase enthalten[27, 28]), so daß nunmehr auch hier die intermediäre Entstehung der Aldehyde in Betracht zu ziehen ist.

Bei diesem Stand der Dinge nimmt es daher nicht wunder, daß der eigentliche Phosphorylierungsakt unbekannt ist. LIPMANN[29]) zieht zwar aus seinen Experimenten an Bakterien die Schlußfolgerung, daß die Phosphorsäure bei der Brenztraubensäuredehydrierung in ähnlicher Weise wie bei der Triosephosphatdehydrierung gebunden wird, und als erstes Reaktionsprodukt Acetylphosphorsäure[30]) entsteht. Aus Untersuchungen an Hirn- und Muskelgewebe[31]) geht aber hervor, daß dieses gemischte Anhydrid hier nicht als Zwischenprodukt des oxydativen Abbaus auftritt.

Die gebundene Phosphorsäure wird auch hier zunächst auf das Adenylsäuresystem übertragen[12, 14, 16, 32]), so daß man in Analogie zur Triosephosphatdehydrierung (Gleichung 4, S. 398) folgende Bilanzgleichung aufstellen kann:

$$\alpha\text{-Ketosäure} + x\,H_3PO_4 + x\,ADP \xrightarrow{-2H} \longrightarrow \text{Fettsäure} + CO_2 + x\,ATP\,.$$

Im Falle der Brenztraubensäure z. B.:

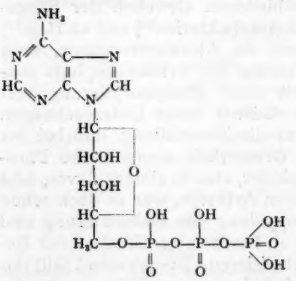
$$\underset{\text{Brenztraubensäure}}{CH_3 \cdot CO \cdot CO_2H} + x\,H_3PO_4 + x\,ADP \xrightarrow{-2H} \longrightarrow \underset{\text{Essigsäure}}{CH_3 \cdot CO_2H} + CO_2 + x\,ATP$$

Dabei soll der Faktor x bedeuten, daß vorderhand über die Zahl der veresterten Phosphorsäuremolekeln keine Aussage gemacht werden kann. Es erscheint nämlich nicht ausgeschlossen, daß bei dieser Dehydrierung mehr als eine Phosphorsäuremolekel in die Reaktion eingeht. Wie COLOWICK, KALCKAR und CORI[32]) an einem zellfreien Extrakt aus Kaninchenherz fanden, werden bei der enzymatischen Oxydation von einer Molekel Glucose nicht weniger als zehn, vielleicht sogar zwölf Molekeln anorganische Phosphorsäure verestert. Wollte man annehmen, daß pro Dehydrierungsreaktion nur eine Molekel Phosphorsäure verestert werden kann, dann müßte, da die vollständige Verbrennung der Glucose 12 Dehydrierungsakte einschließt, jeder mit einer Phosphorylierung verknüpft sein. Nun sind aber, wenn man als Abbauweg den Citronensäurecyclus zugrunde legen will (siehe Schema!), die Übergänge Citronensäure → α-Ketoglutarsäure und Äpfelsäure → Oxalessigsäure sicher nicht mit Phosphorylierungen verknüpft, und auch bei der Reaktion Bernsteinsäure → Fumarsäure erschien bisher eine Mitwirkung von Phosphorsäure recht unwahrscheinlich. Alle diese Dehydrierungsreaktionen sind an mehr oder weniger reinen Enzympräparaten eingehend studiert worden, ohne daß dabei eine Veresterung von Phosphorsäure beobachtet worden wäre. Demgegenüber geht aber aus Untersuchungen der allerletzten Zeit hervor, daß der *Übergang Bernsteinsäure → Fumarsäure* anscheinend doch mit einer Phosphorylierung verknüpft sein kann[33, 34, 35]). Aber auch damit gehen von den zwölf Dehydrierungsreaktionen nur acht (nämlich je zweimal die des Triosephosphats, die der Brenztraubensäure, die der α-Ketoglutarsäure und die der Bernsteinsäure) mit einer Phosphorylierung einher. Es bleibt mithin nur der Ausweg, daß bei einer einzigen Wasserstoffverschiebung gleich mehrere Molekeln Phosphorsäure verestert werden. Oder aber, worauf BELITZER und TSIBAKOVA[33]) hingewiesen haben, die Phosphorsäure wird nicht nur bei der primären Dehydrierung des Substrates aufgenommen, sondern sie tritt auch noch in späteren Stufen, während der Überführung des Wasserstoffs aus dem Substrat zum Sauerstoff der Luft in Reaktion.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß Intermediärreaktionen des Atmungsprozesses anorganische Phosphorsäure binden und an das Adenylsäuresystem abgeben. Bei der Verbrennung der Nahrungsstoffe wird also ebenso wie bei der Gärung *Adenosintriphosphorsäure* gebildet, und es erhebt sich nunmehr die Frage, wie diese Verbindung von der Zelle ausgenützt wird.

Die Adenosintriphosphorsäure als Energiequelle der Zelle.

Die Adenosintriphosphorsäure, für deren Aufbau LOHMANN[36]) Formel I abgeleitet hat, besitzt einen recht beträchtlichen Energieinhalt, der bei der Spaltung in Adenosindiphosphorsäure und Phosphorsäure in Freiheit gesetzt wird. Wie die calorische Messung ergab, werden bei diesem Zerfall etwa 12,5 Cal pro Mol ATP abgegeben. Diese exotherme Aufspaltung der ATP stellt nach LOHMANN[37]) von den bis jetzt nachgewiesenen Vorgängen bei der Muskelkontraktion zeitlich die erste Reaktionsfolge dar.



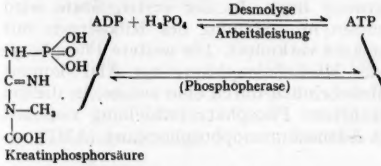
I. Adenosintriphosphorsäure.

Da der eigentliche Fundamentalprozeß der Muskelzuckung noch unbekannt ist, ist es müßig, nach einer Beziehung zwischen diesem und der ATP-Spaltung zu suchen. Es ist aber immerhin

bemerkenswert, daß bei der Fraktionierung der Muskelproteine die Adenylpyrophosphatase, das Ferment, welches die Spaltung der ATP in ADP und Phosphorsäure katalysiert, mit dem Myosin geht, nach Ansicht von ENGELHARDT und LJUBIMOWA[38]) sogar mit dem Myosin identisch ist. Das Myosin wird allgemein als die Basis des kontraktilen Mechanismus der Muskelfibrille angesehen, so daß diese Beobachtungen einen ersten Kontakt zwischen Stoffwechsel und Mechanik des Muskels herstellen*).

Die ATP wird bei der Muskelzuckung gespalten und bei Dehydrierungsreaktionen wieder aufgebaut**). Dabei ist es besonders bemerkenswert, daß Spaltung und Resynthese der im Zellsaft gelösten ATP an ganz verschiedenen Punkten der Zelle erfolgen kann, so daß es berechtigt ist, die ATP mit einem transportablen Akkumulator der Zelle zu vergleichen, der die freie Energie der Dehydrierungsvorgänge dorthin zu schaffen erlaubt, wo sie gerade benötigt wird.

Die „Kapazität" dieses Akkumulators ist verhältnismäßig gering (im Froschmuskel: 0,09 cal/g Frischmuskel***). Er ist in der Muskelzelle mit einem größeren Energiespeicher, dem System: Kreatin-Kreatinphosphorsäure (im Froschmuskel: 0,23 cal/g[37]) „leitend", d. h. in reversibler enzymatischer Reaktion unter Mitwirkung einer spezifischen Phosphopherase (siehe S. 402) verbunden[37]).



Dieses Hilfssystem tritt immer dann in Aktion, wenn mehr ATP verbraucht wird, als die desmolytischen Vorgänge, d. h. Atmung und Gärung, unter den augenblicklichen Bedingungen zu resynthetisieren vermögen. Nachträglich wird die Kreatinphosphorsäure dann auf Kosten der ATP wieder aufgebaut.

Ein anderes Beispiel für diese Art des Energietransportes stellt die Reduktion einer Carboxylgruppe zur Aldehydgruppe dar. Beim Übergang eines Aldehyds in die entsprechende Säure nimmt die freie Energie ab. Soll daher der umgekehrte Vorgang realisiert werden, dann muß Energie von außen her zugeführt werden. Wie bringt die Zelle diese Reduktion zustande?

Wie schon früher (S. 399) betont wurde, sind die Dehydrierung des 1,3-Diphosphoglycerinaldehyds und die sich daran anschließende Phosphatverschiebung jede für sich und damit auch die Gesamtreaktion (Gleichung 4) umkehrbar. In Gegenwart von ATP wird also die Carboxylgruppe der 3-Phosphoglycerinsäure durch Dihydro-codehydrase I zur Aldehydgruppe hydriert. Dabei wird, wie sich MEYERHOF[39]), ohne den genauen Mechanismus dieser Reaktion zu kennen, ausdrückte, „die Energie für die unfreiwillige Reduktion der Phosphoglycerinsäure durch die freiwillige Spaltung der ATP geliefert". Die Arbeiten von WARBURG und seiner Schule[2]) haben dann gezeigt, daß die Zelle zu diesem Zweck die endständige Phosphorsäure der ATP auf die Carboxylgruppe überträgt. Der Energieinhalt des dabei entstehenden gemischten Säureanhydrids, der 1,3-Diphosphoglycerinsäure, liegt aber beträchtlich höher als derjenige der freien Säure[40]), so daß nunmehr die Hydrierung auch vom thermodynamischen Gesichtspunkt aus möglich ist.

Daß diese Hydrierungsreaktion bei der Umkehrung der Glykolyse, der Resynthese von Kohlehydrat aus Milchsäure, die von MEYERHOF[41]) am Muskel entdeckt, von C. und G. CORI[42]) sowie BENOY und ELLIOT[43]) auch in Leber und Niere nachgewiesen wurde, eine Rolle spielt, ist naheliegend. Die einzelnen Stufen des Übergangs von HARDEN-YOUNG-Ester in Milchsäure sind mit einer einzigen Ausnahme reversibel: Diese Ausnahme ist die Überführung der Phosphorsäure aus Phosphobrenztraubensäure auf ADP, die nur in einer Richtung abläuft. Es ist also nicht möglich, aus ATP und Brenztraubensäure rücklaufend wieder zur Phosphobrenztraubensäure zu gelangen. Nun kann aber, wie EPSTEIN und FERDMAN[44]) am Muskel, KALCKAR[45] an Leber und Niere gefunden haben, unter aeroben Bedingungen aus Milchsäure bzw. Äpfelsäure*) in noch unbekannter Reaktion Phosphobrenztraubensäure entstehen, so daß also mit Sauerstoff die irreversible Stufe der Glykolyse umgangen werden kann. Damit steht aber der Synthese des HARDEN-YOUNG-Esters und damit auch der Bildung von freiem Kohlehydrat nichts mehr im Wege. Ein Teil der Milchsäure wird über Brenztraubensäure vollständig verbrannt und liefert dabei ATP und Dihydro-codehydrase I, die für die Hydrierung der aus dem Rest der Milchsäure über Phosphobrenztraubensäure entstandenen Phosphoglycerinsäure notwendig sind.

Die Rolle der Adenosintriphosphorsäure bei Synthesen.

Wie wir gesehen haben, spielen Ester der Phosphorsäure als Intermediärprodukte des Kohlehydratabbaues eine wichtige Rolle. Aber auch sonst noch nehmen organische Phosphate, wie z. B. die Phosphatide, die Nucleotide und die Nucleinsäuren, am Aufbau der Zelle teil. Was nun die biologische Synthese dieser organischen Phosphor-

*) Siehe auch J. NEEDHAM und Mitarbeiter[38a]).

**) Die Resynthese der ATP durch Übertragung der Phosphorsäure von Phosphobrenztraubensäure auf ADP muß hier unberücksichtigt bleiben, da sie einem Kreislauf angehört, bei welchem ATP ihre Phosphatgruppe auf eine Zuckermolekel überträgt und auf der Stufe der Phosphobrenztraubensäure wieder aufnimmt.

***) Diese Energiemenge wird beim Zerfall der ATP in Adenosinmonophosphorsäure (= AMP) und zwei Molekeln Phosphorsäure frei, für welche 25 Cal pro Mol ATP gemessen wurde (s. auch S. 402).

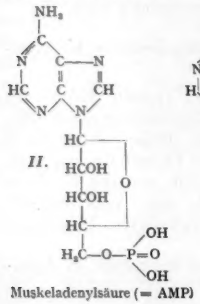
* In Leber und Niere kann Milchsäure in Äpfelsäure übergehen[45a]).

verbindungen betrifft, so entstehen sie nach PARNAS[46]) „in keinem einzigen Fall durch Veresterung von anorganischem Phosphat mit alkoholischen Hydroxylen oder mit Aminogruppen. Ihre Bildung erfolgt entweder durch *Phosphatübertragungen* aus anderen organischen Verbindungen oder aber durch *Spaltung von organischen Anhydriden* unter Aufnahme von Phosphat — nicht durch Aufnahme von Wasser". Diese zweite Möglichkeit soll hier unberücksichtigt bleiben, zumal sie bisher nur an einem einzigen Beispiel, der Phosphorolyse des Glykogens zu CORI-Ester, aufgefunden wurde. Dagegen beansprucht der Mechanismus der Phosphatübertragung in dem speziellen Fall, daß dabei als Phosphatdonator die ATP beteiligt ist, unser besonderes Interesse. Das anorganische Phosphat wird zunächst bei Dehydrierungsreaktionen gebunden, anschließend auf das Adenylsäuresystem übertragen und von dort erst auf die Hydroxyl- oder Aminogruppe umgeestert. Die Fermente dieser Phosphatübertragung werden von PARNAS „*Phosphopherasen*" genannt.

Die Verschiebung der Phosphorsäure von ATP auf Glucose, bei welcher Hexosemono- und schließlich Hexosediphosphorsäure (ROBISON- bzw. HARDEN-YOUNG-Ester) entstehen, wurde schon früher erwähnt (S. 399). Abgesehen von ihrer Bedeutung als einleitende Reaktion des Kohlehydratabbaues, spielt diese Phosphorylierung auch bei der Resorption des Zuckers in Darm[47]) und Niere[12, 48]) eine wichtige Rolle, so daß in diesem speziellen Fall die innigen Beziehungen, die zwischen den spezifischen Leistungen eines Organs und dem energieliefernden Stoffabbau bestehen, klar zutage treten.

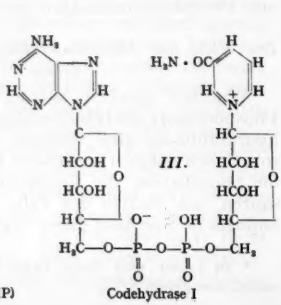
Die Umesterung der Phosphorsäure von ATP auf Kreatin ist ebenfalls schon besprochen worden (S. 401). Kurz erwähnt sei noch, daß auch die Phosphorylierung des Glycerins zu α-Glycerinphosphorsäure, die man als den ersten Schritt zur Synthese eines Phosphatids ansehen kann, in der Niere nur unter Sauerstoff vor sich geht[45]), unter Bedingungen also, unter denen ATP gebildet wird.

Dagegen soll die biologische Synthese der Nucleotide im Hinblick auf die wichtigen Funktionen, welche diese Körperklasse als Bausteine der Nucleinsäuren und als Cofermente oder prosthetische Gruppen in der Zelle ausüben, eingehend behandelt werden.



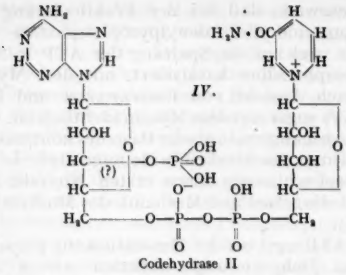
II.

Muskeladenylsäure (= AMP)



III.

Codehydrase I



IV.

Codehydrase II

ATP, das in diesem Aufsatz so eingehend behandelte *Coferment der Phosphatverschiebung*, leitet sich von der Muskeladenylsäure (II) und damit von dem Nucleosid Adenosin ab. Es gelang OSTERN, BARANOWSKI und TERSZAKOWEC[49]) mit gärender Acetonhefe, CORI, COLOWICK und KALCKAR[32]) mit einer atmenden Enzymlösung aus Kaninchenniere Adenosin in ATP überzuführen. Da sowohl bei der Gärung als auch bei der Atmung die anorganische Phosphorsäure zunächst von ADP aufgenommen wird und im allgemeinen von dort erst auf die phosphorylierbaren Stoffe, die Phosphatacceptoren, übertragen wird, darf man wohl annehmen, daß auch der Veresterung des Adenosins dieser Mechanismus zugrunde liegt. In der ersten Stufe wird das Adenosin in 5-Stellung des Riboserests mit Phosphorsäure verknüpft. Die weitere Phosphorylierung der Muskeladenylsäure zur ADP kommt dann wahrscheinlich durch eine zweite, in diesem Fall umkehrbare Phosphatverschiebung zwischen ATP und Adenosinmonophosphorsäure (AMP) zustande.

Dies ist zwar noch nicht exakt bewiesen, wird aber durch mehrere Beobachtungen wahrscheinlich gemacht. Wie BARANOWSKI[50]) feststellte, sind bei der Übertragung der Phosphorsäure aus Phosphobrenztraubensäure auf AMP zwei Fermente notwendig, von denen sich das eine durch seine große Hitzebeständigkeit auszeichnet. Nimmt man an, daß eines der beiden Enzyme die Reaktion:

$$\text{Phosphobrenztraubensäure} + \text{ADP} \rightarrow \text{Brenztraubensäure} + \text{ATP},$$

das andere die Reaktion:

$$\text{ATP} + \text{AMP} \rightleftharpoons 2\ \text{ADP}$$

katalysiert, dann ist diese Beobachtung zwanglos erklärt.

In gleicher Weise kann man auch den Befund von COLOWICK und KALCKAR[51]) erklären, daß Hexokinase, in deren Gegenwart die Reaktion:

$$\text{ATP} + \text{Hexose} \rightarrow \text{ADP} + \text{Hexose-6-phosphat}$$

erfolgt, durch einen hitzestabilen, für sich allein nicht wirksamen Eiweißkörper aus Muskel ergänzt werden kann, so daß nunmehr auch die Reaktion

$$\text{ADP} + \text{Hexose} \rightarrow \text{AMP} + \text{Hexose-6-phosphat}$$

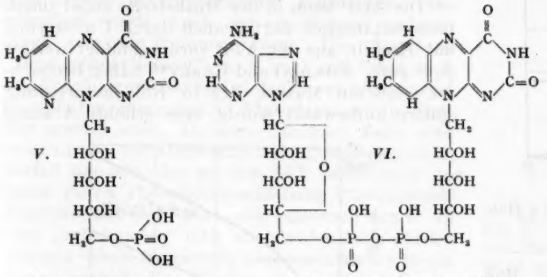
abläuft. Man braucht nur anzunehmen, daß auch hier das hitzestabile Protein die reversible Reaktion

$$2\ \text{ADP} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{ATP}$$

durchführt.

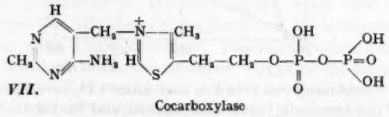
Erst die ADP übernimmt dann die Phosphorsäure direkt von den Phosphatdonatoren.

Ein weiteres Beispiel für diese Art der Phosphorylierung wird bei der biologischen Synthese der Codehydrasen I und II, der *Cofermente der Wasserstoffverschiebung* angetroffen. Wie LENNERSTRAND[52]) fand, wird Codehydrase I (III) durch ausgewaschene, nicht mehr gärfähige Trockenhefe inaktiviert, aber im selben System auch wieder aufgebaut, wenn man durch geeignete Zusätze nachträglich eine Gärung in Gang bringt. Und auch die lebende Hefe ist nur dann imstande die Codehydrase aus Adenin und Nicotinsäureamid zu synthetisieren, wenn ihr gleichzeitig Zucker angeboten wird. Es besteht also auch hier die Voraussetzung, daß ständig ATP neu gebildet wird, denn wird diese Reaktion unterbunden, sei es, daß keine Nahrungsstoffe vorhanden sind oder daß die desmolytischen Vorgänge durch Fluorid vergiftet werden, dann bleibt die Synthese des Coferments aus. Was schließlich die Phosphorylierung der Codehydrase I zu Codehydrase II (IV) betrifft, so ist es durch die Untersuchung von ADLER, S. und L. ELLIOT[53]) an Hefesaft bewiesen, daß auch hier die Phosphorsäuremolekel aus der ATP stammt.



V. Lactoflavinphosphorsäure

VI. Alloxazin-adenin-dinucleotid



VII. Cocarboxylase

Über den Verlauf der Synthesen von Lactoflavinphosphorsäure (V) und Alloxazin-adenin-dinucleotid (VI), den prosthetischen Gruppen der verschiedenen „gelben Fermente", sind wir nur mangelhaft unterrichtet. Aus Analogiegründen ist es aber doch wahrscheinlich, daß auch hier die Phosphorsäure durch eine Umesterung mit ATP eingeführt wird. Im Falle der Lactoflavinphosphorsäure liegt sogar ein direkter Anhaltspunkt dafür vor. PULVER und VERZÁR[54]) fanden, daß Jodessigsäure, deren Giftwirkung auf die Dehydrierung des Triosephosphats und damit auf die Bildung der ATP bekannt ist, die Phosphorylierung des Lactoflavins in der Darmschleimhaut verhindert.

Im Gegensatz dazu ist der Aufbau der Cocarboxylase (VII) weitgehend geklärt. Wie WEIL-MALHERBE[55]) unter Verwendung eines gereinigten Enzympräparates aus Hefe darlegen konnte, kommt die Synthese dieses Co-Ferments durch eine Phosphatverschiebung zwischen Aneurin und ATP zustande. Da ATP in der Hefe sowohl bei der Gärung als auch bei der Atmung entsteht[15]), ist es verständlich, daß lebende Hefe unter diesen Bedingungen zugesetztes Aneurin in Cocarboxylase überführt und als solche in ihrem Innern speichert[56]).

Daß die ATP schließlich auch bei der Synthese der Nucleinsäuren beteiligt ist, entbehrt vorderhand noch des experimentellen Beweises. Es besteht aber doch einige Wahrscheinlichkeit, daß die Zelle beim Aufbau der hochmolekularen Polynucleotide denselben Phosphorylierungsmechanismus in Anwendung bringt, den sie auch bei der Synthese der Mono- und Dinucleotide benützt. Berücksichtigt man, daß die Nucleinsäuren nach den Untersuchungen CASPERSSONS[57]) bei der biologischen Eiweißsynthese und damit beim Zellwachstum und der Zellvermehrung eine wichtige Rolle spielen, dann darf man wohl erwarten, daß gerade das Studium dieser Posphorylierungsreaktionen eine neue Brücke zwischen Desmolyse und Wachstum schlagen wird.

Die Bedeutung der oxydoreduktiven Phosphorylierung im Regulationsmechanismus der Zelle.

Zuletzt spielen die oxydoreduktiven Phosphorylierungsvorgänge bei der Steuerung des Stoffabbaues in der Zelle eine wichtige Rolle. Es ist eine bekannte Tatsache, daß lebende Hefe den Zucker zu Alkohol und Kohlensäure vergärt, während in desorganisierten Systemen, wie Hefepreßsaft, Macerationssaft, plasmolysierter oder getrockneter Hefe außerdem noch beträchtliche Mengen eines Zwischenprodukts, des HARDEN-YOUNG-Esters, in Erscheinung treten. Wie kommt dieser Unterschied zustande? An eine Verschiedenheit der Reaktionsfolge kann, nachdem auch in der intakten Hefe der HARDEN-YOUNG-Ester als Zwischenprodukt nachgewiesen wurde[58-61]), nicht mehr gedacht werden. Es bleibt also nur der Ausweg, daß die Struktur der lebenden Zelle mit dieser Überlegenheit etwas zu tun hat. Vor allem ist daran zu denken, daß die Hefemembran dabei eine Rolle spielt, zumal sie, wie aus den Untersuchungen von HEVESY, LINDERSTRØM-LANG und NIELSEN[62]) und von MAC FARLANE[59]) hervorgeht, für anorganisches Phosphat nahezu vollständig impermeabel ist. Die Hefezelle stellt also in bezug auf die Phosphorsäure ein weitgehend abgeschlossenes System dar, dessen Phosphatgehalt von der Konzentration des umgebenden Mediums unabhängig ist. Wird die lebende Hefe mit einer Zuckerlösung zusammengebracht, dann dringt das Kohlehydrat in die Zelle ein und wird dort vergoren. Wie aus Fig. 1 hervorgeht, die einer Arbeit von MAC FARLANE entnommen ist, wird

dabei Phosphorsäure verestert. In den ersten Augenblicken treffen wir also in der lebenden Hefe genau dieselben Erscheinungen an wie bei der zellfreien Gärung; hier wie dort verschwindet anorganische Phosphorsäure. Würde jedoch in der lebenden Hefe die Zuckerspaltung in dieser Form weiterlaufen, dann wäre nach kurzer Zeit alles Phosphat der Hefe verbraucht, und damit würde über die Dehydrierung des Triosephosphats (s. S. 398) die gesamte Gärung zum Stillstand kommen. Tatsächlich findet man aber, daß die Phosphatkonzentration nur bis zu einem bestimmten Wert abnimmt, dann gleichbleibt und nach Verbrauch des Zuckers wieder zunimmt (Fig. 1). In der lebenden Hefe ist also ein Dephosphorylierungsmechanismus tätig, der die gebundene Phosphorsäure wieder in Freiheit setzt, und die stationäre Phosphatkonzentration im Verlauf der Gärung kommt nur durch die Gleichheit von Phosphorylierung und Dephosphorylierung zustande. Wie WARBURG und CHRISTIAN[2]) gefunden haben, hängt aber die Geschwindigkeit der Triosephosphatdehydrierung und damit selbstverständlich auch die Geschwindigkeit der Phosphorylierung vom Phosphatgehalt der Lösung ab, so daß dieser stationären Phosphatkonzentration im Innern der Hefe ein gewisser Zuckerumsatz entsprechen muß. Es ist nun ohne weiteres einzusehen, daß die lebende Hefe gar nicht in der Lage ist, den HARDEN-YOUNG-Ester in größerer Menge anzuhäufen. In diesem Fall würde ja anorganische Phosphorsäure aus der Zelle verschwinden, was notgedrungen zu einer Verlangsamung der Dehydrierungsreaktion führen müßte. Damit würde aber die Bildung von ATP und folglich auch die Bildung des HARDEN-YOUNG-Esters sofort wieder abgebremst werden. Die Anhäufung des HARDEN-YOUNG-Esters hemmt also seine Bildung, so daß er sich in der lebenden Hefe nicht ansammeln kann.

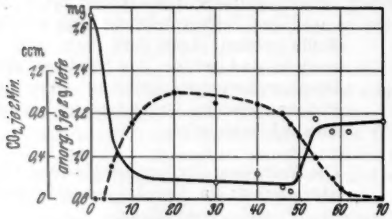


Fig. 1. *Die Gärung in lebender Hefe.* •···· ccm CO_2 je 2 Min. ○— mg anorg. P je 2 g Hefe [nach M. MAC FARLANE[59]), Tabelle 3].

Wie wir im ersten Abschnitt dieser Zusammenfassung gesehen haben, wird bei Atmung und Gärung aus ADP und anorganischer Phosphorsäure ATP gebildet. Es ist also für einen unbehinderten Ablauf dieser Reaktionen notwendig, daß ADP vorhanden ist, so daß in der Zelle, in der die Adenosinphosphorsäuren ja nur in verhältnismäßig geringer Menge vorkommen, die ADP immer wieder aus der ATP zurückgebildet werden muß. Diese Regeneration kann unter Umständen die geschwindigkeitsmessende Reaktion der Desmolyse darstellen.

DISCHE[7]) fand, daß ohne Glucose vorbebrütete Erythrocyten, bei denen Dephosphorylierungsprodukte der ATP angehäuft sind, eine zusätzliche Glykolyse zeigen, die so lange dauert, bis die ATP wieder aufgebaut ist.

Auch in der Muskelzelle hängt die Atmung von der Geschwindigkeit ab, mit welcher die ADP aus der ATP zurückgebildet wird. So kommt es, daß 2,4-Dinitrophenol die normale Sauerstoffaufnahme des Froschmuskels auf das 6—10fache erhöht. RONZONI und EHRENFEST[63]) haben gefunden, daß das Phenol in erster Linie den enzymatischen Zerfall der ATP aktiviert und daß die Atmungssteigerung eine Folge dieser Primärreaktion ist. Es paßt zu dieser Anschauung ausgezeichnet, daß in Gegenwart von 2,4-Dinitrophenol auch die anaerobe Glykolyse im Muskel 6—8mal rascher abläuft als in der unbehandelten Kontrolle.

Die ADP kann in der Muskelzelle außer durch phosphatatischen Zerfall auch durch Umesterung mit Kreatin aus der ATP zurückgebildet werden (s. S. 401). RONZONI und KERLY[64]) haben beobachtet, daß ein Muskel, der in Kohlensäureatmosphäre aufbewahrt wurde, eine erhöhte Atmung zeigt, während welcher die Kreatinphosphorsäure, die im Verlauf der Anaerobiose hydrolysiert worden war, wieder aufgebaut wird (Fig. 2). Die Atmungssteigerung kommt in diesem Fall dadurch zustande, daß die ATP ihre endständige Phosphorsäure auf Kreatin überträgt, und dann bei Dehydrierungsreaktionen wieder phosphoryliert werden kann. Die zusätzliche Atmung hört daher auch im selben Moment auf, in welchem das gesamte Kreatin in Kreatinphosphorsäure übergegangen ist*).

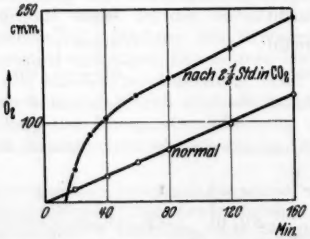


Fig. 2. *Atmung von frischen und unter CO_2 vorbehandelten Froschmuskeln* [nach E. RONZONI und M. KERLY[64])].

Diese Steuerung der energieliefernden Vorgänge in der Muskelzelle gibt für viele Beobachtungen eine einfache Erklärung. Wir müssen uns daran erinnern, daß bei der Muskelkontraktion zunächst die ATP zerfällt (S. 400), daß also in einem

*) Die Rolle des Kreatins als Phosphatacceptor bei der Muskelatmung ist vor allem auch durch die Untersuchungen von BELITZER[33 65]) klargelegt worden.

arbeitenden Muskel mehr ADP aus ATP zurückgebildet wird als in einem ruhenden Muskel. Es ist daher ohne weiteres verständlich, daß der arbeitende Muskel mehr Sauerstoff verbraucht, wie dies auch vom energetischen Gesichtspunkt aus als sinnvoll erscheint.

Auch die erhöhte Atmung, die mit der Restitution des Kohlehydrats aus Milchsäure in einem durch anaerobe Tätigkeit ermüdeten Muskel einhergeht[41]), ist wohl auf die gleiche Ursache zurückzuführen. Der Übergang der Milchsäure in Kohlehydrat ist wahrscheinlich mit der Spaltung von ATP in ADP und Phosphorsäure verbunden (S. 401). Solange also noch Milchsäure vorhanden ist, wird ATP in einer zusätzlichen Reaktion gespalten und daher mehr Sauerstoff verbraucht als in der milchsäurefreien Kontrolle. Dieses Beispiel ist auch noch aus einem anderen Grund recht bemerkenswert, zeigt es doch, daß der Zerfall der ATP in ADP und Phosphorsäure, den man formal der Wirkung einer Phosphatase, d. h. eines hydrolysierenden Fermentes, zuschreiben würde, auch auf einem ganz anderen Wege zustande kommen kann. Der Ausdruck „Dephosphorylierung" (s. S. 404) soll daher auch alle Vorgänge umfassen, bei denen aus organischen Phosphaten anorganische Phosphorsäure in Freiheit gesetzt wird. In einer ruhenden Zelle wird es sich dabei vor allem um einen phosphatatischen Zerfall handeln, der an der ATP selbst oder an einem durch Phosphatverschiebung entstandenen Folgeprodukt (s. S. 402—403) einsetzen kann. In einer „arbeitenden" oder wachsenden Zelle werden dagegen neben diesen rein phosphatatischen Reaktionen auch andere Mechanismen, wie z. B. die oben besprochene Reaktionsfolge oder die Reversion der Glykogenphosphorolyse, in steigendem Maße zum Zuge kommen. In wachsenden Zellen ist daneben noch ein anderer Vorgang zu berücksichtigen, bei welchem ATP zur Synthese von organischen Phosphaten, wie z. B. Nucleotiden und Nucleinsäuren, unter Rückbildung der ADP herangezogen wird und gleichzeitig anorganische Phosphorsäure von außen her in die Zelle eintritt.

Nachdem die Phosphorylierungsvorgänge bei der Steuerung der Atmungs- und Gärungsvorgänge eine so wichtige Rolle spielen, ist es naheliegend, daß auch die „PASTEURsche Reaktion", die Atmung und Gärung miteinander verbindet[65]), auf die gleiche Ursache zurückzuführen ist. Die „PASTEURsche Reaktion", die sich darin äußert, daß in der lebenden Zelle unter Sauerstoff sehr viel weniger Kohlehydrat abgebaut wird als anaerob, stellt energetisch gesehen einen überaus sinnvollen Mechanismus der Zelle dar. Wir müssen uns vor Augen halten, daß die maximale Arbeit, die bei der Vergärung von einem Mol Glucose zu Alkohol und Kohlensäure bzw. Milchsäure frei wird, 55 bzw. 33 Cal beträgt, während bei der vollständigen Verbrennung derselben Zuckermenge 685 Cal gewonnen werden[67]). Will also die Hefezelle ein und dieselbe Energiemenge einmal durch die alkoholische Gärung und das andere Mal durch die Atmung erzeugen, dann muß sie im ersten Fall, d. h. bei der Gärung, rund 12 mal soviel Zucker umsetzen, als bei der Atmung.

Wahrscheinlich kommt die „PASTEURsche Reaktion" durch die Konkurrenz von Atmung und Gärung um das anorganische Phosphat und das Adenylsäuresystem der Zelle zustande[15]). Es ist ja ohne weiteres einzusehen, daß in einer Zelle, in welcher die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung den Stoffabbau begrenzt, die Phosphatbindung bei der Gärung und damit die Gärung selbst zurückgedrängt werden müssen, wenn in Gegenwart von Sauerstoff noch die Phosphorylierung bei der Atmung dazukommt. Der Zuckerumsatz wird dabei in allen Zellen, die Glucose direkt phosphorylieren können, bei der Dehydrierung des Triosephosphats abgebremst werden. In Muskelzellen dagegen, in welchen der Kohlehydratabbau beim

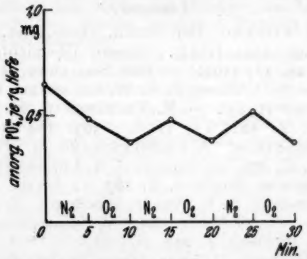


Fig. 3. *Die* PASTEURsche *Reaktion.* Phosphatgehalt von Bäckerhefe, die in zuckerhaltiger Lösung abwechselnd unter aeroben und anaeroben Bedingungen gehalten wurde [nach F. LYNEN[15])].

Glykogen einsetzt, kann möglicherweise schon dessen Phosphorolyse verlangsamt sein. Aber in beiden Fällen ist wohl die Erniedrigung des Gehaltes an Orthophosphat, der am Beispiel der Hefe direkt beobachtet werden konnte (Fig. 3), der eigentliche Anlaß zu dieser Hemmung*).

Mit den quantitativen Beziehungen zwischen Atmung und Gärung steht diese Vorstellung in bester Übereinstimmung. WARBURG[69]) fand als maximale Wirkung der „PASTEURschen Reaktion", daß 1 Molekel veratmeten Sauerstoffs 2 Molekeln Alkohol oder Milchsäure am Erscheinen verhindern kann. Da bei der Gärung pro Molekel Alkohol oder Milchsäure 1 Molekel Phosphorsäure verestert wird, bedeutet dies, daß bei der Atmung pro Molekel Sauerstoff 2 Molekeln Phosphorsäure gebunden werden müßten. Die vollständige Oxydation einer Glucosemolekel müßte demnach mit der Veresterung von insgesamt 12 Molekeln Phosphorsäure verknüpft sein, wie

*) Diese Anschauung hat selbstverständlich zur Voraussetzung, daß auch in der tierischen Zelle die Diffusion des anorganischen Phosphats ins Innere der Zelle im Vergleich mit dem Stoffumsatz bei den desmolytischen Reaktionen ein relativ langsamer Vorgang ist. Vgl. dazu [68]).

dies COLOWICK, KALCKAR und CORI[32]) in ihren Versuchen auch tatsächlich gefunden haben.

Diese Beispiele mögen genügen, um die Bedeutung der oxydoreduktiven Phosphorylierung im Regulationsmechanismus der Zelle, der ja ohne Zweifel mit zu den eindrucksvollsten Äußerungen des Lebens gehört, zu beleuchten. Wir stehen auch hier wieder voll Staunen vor dem in seiner Einfachheit und Zweckmäßigkeit wunderbaren Spiel der Natur. Durch die Verknüpfung der WIELANDschen „Wasserstoffverschiebung" mit der „Phosphatverschiebung", deren Studium auf die grundlegenden Untersuchungen von K. LOHMANN über die Adenosintriphosphorsäure und von J. PARNAS über den Kreislauf des Phosphats bei der Glykolyse zurückgeht, ist den Zellen *eine* Möglichkeit gegeben, die Ausnutzung des Energieinhalts der Nahrungsstoffe zu regeln und damit auch die Besonderheiten ihres Stoffwechsels zu gestalten.

Literatur.

[1]) H. WIELAND, Ber. dtsch. chem. Ges. **45**, 448 (1912); **46**, 3325 (1913). Neuere Übersichten: Erg. Physiol. **20**, 477 (1922) — Bull. Soc. chim. [5] **5**, 1233 (1938). — [2]) O. WARBURG u. W. CHRISTIAN, Biochem. Z. **303**, 40 (1939). — E. NEGELEIN u. H. BRÖMEL, Biochem. Z. **301**, 135 (1939); **303**, 132 (1939). — [3]) J. RUNNSTRÖM, A. LENNERSTRAND u. H. BOREI, Biochem. Z. **271**, 15 (1934). — A. LENNERSTRAND u. J. RUNNSTRÖM, Biochem. Z. **283**, 12 (1935). — [4]) D. M. NEEDHAM u. R. K. PILLAI, Biochemic. J. **31**, 1837 (1937). — [5]) O. MEYERHOF, W. KIESSLING u. W. SCHULTZ, Biochem. Z. **292**, 25 (1937). — [6]) A. SCHÄFFNER, E. BAUER u. H. BERL, Hoppe-Seylers Z. **233**, 213 (1935). — [7]) Z. DISCHE, Naturwiss. **22**, 855 (1934) — Enzymol. **1**, 288 (1936). — [8]) A. HARDEN u. W. J. YOUNG, Proc. Chem. Soc. **21**, 189 (1905). — [9]) E. LUNDSGAARD, Biochem. Z. **227**, 64 (1930). — O. MEYERHOF u. E. BOYLAND, Biochem. Z. **237**, 416 (1931). — [10]) A. J. CLARK, M. G. EGGLETON u. P. EGGLETON, J. of Physiol. **75**, 332 (1932). — [11]) W. A. ENGELHARDT, Biochem. Z. **227**, 16 (1930); **251**, 343 (1932). — [12]) H. KALCKAR, Enzymol. **2**, 47 (1937). — [13]) I. BANGA, S. OCHOA u. R. A. PETERS, Biochemic. J. **33**, 1980 (1939). — [14]) F. LIPMANN, Enzymol. **4**, 65 (1937) — Nature (Lond.) **143**, 281 (1939). — [15]) F. LYNEN, Liebigs Ann. **546**, 120 (1941). — [16]) S. OCHOA, Nature (Lond.) **145**, 747 (1940). — [17]) H. KALCKAR, Enzymol. **6**, 209 (1939). — [18]) H. A. KREBS, Hoppe-Seylers Z. **218**, 157 (1933). — [19]) C. MARTIUS, Hoppe-Seylers Z. **247**, 104 (1937). — [20]) H. A. KREBS, Hoppe-Seylers Z. **217**, 215 (1933). — [21]) H. A. KREBS u. W. A. JOHNSON, Enzymol. **4**, 148 (1937). — F. LYNEN u. N. NECIULLAH, Liebigs Ann. **541**, 203 (1939). — H. A. KREBS u. L. V. EGGLESTON, Biochemic. J. **34**, 442 (1940). — E. A. EVANS, Biochemic. J. **34**, 829 (1940). — D. H. SMYTH, Biochemic. J. **34**, 1046 (1940). — H. A. KREBS, L. V. EGGLESTON, A. KLEINZELLER u. D. H. SMYTH, Biochemic. J. **34**, 1234 (1940). — [22]) W. FRANKE, Angew. Chem. **52**, 695, 703 (1939). — [23]) A. E. BRAUNSTEIN, Enzymol. **7**, 25 (1939). — [24]) H. WIELAND, O. PROBST, H. WALCH, W. SCHWARZE u. K. RAUCH, Liebigs Ann. **542**, 145 (1939). — [25]) J. RUNNSTRÖM u. E. SPERBER, Ark. Kem. Mineral. Geol. **15** A, Nr 5 (1941). — [26]) C. LONG u. R. A. PETERS, Biochemic. J. **33**, 759 (1939). — [27]) M. SILVERMAN u. C. H. WERKMAN, J. of biol. Chem. **138**, 35 (1941). — [28]) D. E. GREEN, W. W. WESTERFELD, B. VENNESLAND u. W. E. KNOX, J. of biol. Chem. **140**, 683 (1941). — [29]) F. LIPMANN, J. of biol. Chem. **134**, 463 (1940). — [30]) F. LYNEN, Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 367 (1940). — [31]) S. OCHOA, R. A. PETERS u. L. A. STOCKEN, Nature (Lond.) **144**, 750 (1939). — [32]) S. P. COLOWICK, H. M. KALCKAR u. C. F. CORI, J. of biol. Chem. **137**, 343 (1941). — [33]) V. H. BELITZER u. E. T. TSIBAKOVA, Biochimia **4**, 516 (1939); zit. nach Chem. Zbl. **1941 I**, 1313. — [34]) S. P. COLOWICK, M. S. WELCH u. C. F. CORI, J. of biol. Chem. **133**, 359 (1940). — [35]) S. OCHOA, Nature (Lond.) **146**, 267 (1940). — [36]) K. LOHMANN, Biochem. Z. **282**, 120 (1935). — [37]) K. LOHMANN, Naturwiss. **22**, 409 (1934); in C. OPPENHEIMER, Handb. d. Biochemie, Erg.-Bd. 3, S. 351. Jena 1936. — [38]) W. A. ENGELHARDT u. M. N. LJUBIMOWA, Nature (Lond.) **144**, 668 (1939). — [38a]) J. NEEDHAM, S. CHANG SHEN, D. M. NEEDHAM u. A. S. C. LAWRENCE, Nature (Lond.) **147**, 766 (1941). — [39]) O. MEYERHOF, P. OHLMEYER u. W. MÖHLE, Biochem. Z. **297**, 113 (1938). — [40]) W. FRANKE, Angew. Chem. **53**, 592 (1940). — [41]) O. MEYERHOF, Die chemischen Vorgänge im Muskel. Berlin 1930. — [42]) C. F. CORI u. G. T. CORI, J. of biol. Chem. **81**, 389 (1929). — [43]) M. P. BENOY u. K. A. C. ELLIOT, Biochemic. J. **31**, 1268 (1937). — [44]) D. L. FERDMAN u. S. F. EPSTEIN, Science (N. Y.) **91**, 365 (1940); zit. nach Chem. Zbl. **1940 II**, 2915. — [45]) H. KALCKAR, Biochemic. J. **33**, 631 (1939). — [45a]) H. A. KREBS u. L. V. EGGLESTON, Biochemic. J. **34**, 1383 (1940); F. LYNEN, unveröffentlichte Versuche. — [46]) J. K. PARNAS, Erg. Enzymforsch. **6**, 64 (1937). — [47]) W. WILLBRANDT u. L. LASZT, Biochem. Z. **259**, 398 (1933). — [48]) E. LUNDSGAARD, Biochem. Z. **264**, 209 (1933). — [49]) P. OSTERN, T. BARANOWSKI u. I. TERSZAKOWEC, Hoppe-Seylers Z. **251**, 258 (1938). — [50]) P. BARANOWSKI, Enzymol. **5**, 262 (1938/39). — [51]) S. P. COLOWICK u. H. M. KALCKAR, J. of biol. Chem. **137**, 789 (1941); zit. nach Chem. Zbl. **1941 II**, 2574. — [52]) A. LENNERSTRAND, Ark. Kem., Mineral. Geol. **14** A, Nr 16, 68 (1941). — [53]) E. ADLER, S. ELLIOT u. L. ELLIOT, Enzymol. **8**, 80 (1940). — [54]) R. PULVER u. F. VERZÁR, Enzymol. **6**, 333 (1939). — [55]) H. WEIL-MALHERBE, Biochemic. J. **33**, 1997 (1939). — [56]) E. SPERBER u. S. RENVALL, Biochem. Z. **310**, 100 (1941). — [57]) T. CASPERSSON, Naturwiss. **29**, 33 (1941). — T. CASPERSSON u. K. BRANDT, Protoplasma (Berl.) **25**, 507 (1941). — [58]) M. LEWITOW, Biochem. Z. **284**, 86 (1936). — [59]) M. MACFARLANE, Biochemic. J. **30**, 1369 (1936); **33**, 565 (1939). — [60]) K. KRUYK u. V. KLINGMÜLLER, Biochem. Z. **300**, 343 (1939). — [61]) A. MIRSKY u. E. WERTHEIMER, Enzymol. **7**, 58 (1939). — [62]) G. HEVESY, K. LINDERSTRØM-LANG u. N. NIELSEN, Nature (Lond.) **140**, 725 (1937). — [63]) E. RONZONI u. E. EHRENFEST, J. of biol. Chem. **115**, 749 (1936). — [64]) E. RONZONI u. M. KERLY, J. of biol. Chem. **103**, 175 (1933). — [65]) V. A. BELITZER, Enzymol. **6**, 1 (1939). — [66]) O. WARBURG, Biochem. Z. **172**, 435 (1926). — [67]) W. FRANKE, in Tabul. biolog. **11**, 132 (1935). — [68]) G. HEVESY, J. chem. Soc. (Lond.) **1939**, 1218 — Ann. Rev. Biochem. **9**, 647 (1940). — [69]) O. WARBURG, Biochem. Z. **184**, 484 (1927).

Kurze Originalmitteilung.

Für die kurze Originalmitteilung ist ausschließlich der Verfasser verantwortlich.

Über die Wirkungsweise eines geschlechtsbestimmenden Stoffes (Borsäure).

Bringt man zwittrige Zellen ♂ der Grünalge *Chlamydomonas* in eine Lösung, in der sich diözisch weibliche ♀-Gameten dieser Alge befunden hatten, so werden die ♂-Zellen zu Weibchen, die mit diözisch männlichen ♂-Gameten kopulieren. Den im Filtrat der ♀-Zellen enthaltenen geschlechtsbestimmenden Stoff haben wir *Gynotermon* genannt. Dieselbe Wirkung entfaltete das kristallisierte 4-Oxy-2,6,6-trimethyl-Δ^1-tetrahydrobenzaldehyd-β,d-glucosid (Pikrocrocin) aus den Narben von Crocus. Der durch enzymatische Hydrolyse des Pikrocrocins gewonnene linksdrehende 4-Oxy-2,6,6-trimethyl-Δ^1-tetrahydrobenzaldehyd sowie der daraus durch Wasserabspaltung entstehende optisch inaktive 2,6,6-Trimethyldihydrobenzaldehyd (Safranal) vermögen umgekehrt als *Androtermone* den ♂-Zellen männlichen Charakter zu verleihen, so daß sie mit diözischen ♀-Gameten kopulieren[1]).

Um Kopulationsvermögen der Zwitter zu erzielen, waren je Zelle einerseits ~1 000 000 Molekeln Pikrocrocin erforderlich, andererseits ~10 Molekeln Safranal oder ~1,5 Molekeln des entsprechenden Oxyaldehyds.

Ihrer chemischen Natur nach waren die bis vor kurzem beschriebenen Termone eng verknüpft mit dem Beweglichkeitsstoff (Crocin) und den Kopulationsstoffen von Chlamydomonas (*cis-* und *trans*-Crocetindimethylester), die gleichfalls aus den Narben von Crocus isoliert und wie die Termone als Spaltstücke eines glykosidischen Carotinfarbstoffes aufgefaßt werden konnten. Von Bedeutung wurde die Feststellung, daß nur die ♂-Gameten, welche den Oxyaldehyd ausscheiden, imstande sind, Pikrocrocin zu hydrolysieren, während alle Versuche, eine enzymatische Spaltung dieses Glucosids durch ♀-Gameten nachzuweisen, fehlschlugen. Damit war ein stofflicher Unterschied zwischen den isogamen, auch bei noch so genauer mikroskopischer Untersuchung nicht differenzierbaren männlichen und weiblichen Geschlechtszellen geklärt: nur die ♂-Gameten besitzen das pikrocrocinspaltende Ferment[2]).

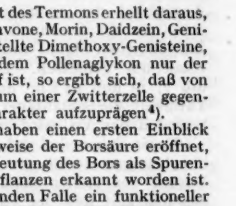
Es wurde jetzt gefunden, daß ♀-Zellen von *Chlamydomonas* ähnlich wie durch den Oxyaldehyd (Safranal) auch durch *Borsäure* in Konzentrationen bis zu $1:10^{10}$ (g : ccm) gegenüber ♀-Gameten kopulationsfähig werden. Dies entspricht ~500 000 Molekeln H_3BO_3 je Zelle. Die Borsäure erscheint damit als anorganisches *Androtermon*. In höheren Konzentrationen ($1:10^6$) macht Borsäure diözische ♀-Gameten kopulationsunfähig.

Den Schlüssel zum Verständnis der Borsäurewirkung hat das aus den Pollen einer lilablühenden Crocusart (Sir John Bright) isolierte Glykosid[3]) geliefert. Dieses Glykosid zerfällt bei der Hydrolyse mit Säure in 1 Mol eines gelben kristallisierten Farbstoffs und 2 Mole d-Glucose. Das *gelbe Aglykon* wirkt auf ♀-Zellen von Chlamydomonas als *Gynotermon* und ist als solches ~ 100 000 mal wirksamer als Pikrocrocin. Dieser außerordentliche Unterschied hat zu der Vermutung geführt, daß reinstes Pikrocrocin gar keine Termonwirkung besitzen wird und die den kristallisierten Präparaten zukommende Aktivität darauf beruht, daß sie von der Darstellung aus den Crocusnarben her noch etwa 0,001 % des gelben Aglykons oder eines ähnlichen gelben Farbstoffs enthalten. Für die Richtigkeit dieser Vermutung spricht der Befund, daß Pikrocrocinlösungen nach erschöpfender Hydrolyse durch verd. Schwefelsäure und restlosem Verjagen des Safranals durch Wasserdampf noch immer eine Gynotermonwirkung besitzen, die derjenigen nahekommt, welche bei Annahme einer Verunreinigung durch das gelbe Aglykon zu erwarten war. Es ist somit recht wahrscheinlich, daß das Pikrocrocin nur als Muttersubstanz des 4-Oxy-2,6,6-trimethyl-Δ^1-tetrahydrobenzaldehyds, der mit ~1,5 Molekeln je Zelle als Androtermon wirkt, physiologische Bedeutung hat. Die Funktion des Gynotermons dürfte allein dem gelben Aglykon zuzuschreiben sein, dessen absolute Wirksamkeit derjenigen des Oxyaldehyds nahekommt. Dabei bleibt es unentschieden, ob der aus dem Pollenglykosid kristallisiert erhaltene Stoff mit dem von den ♀-*Chlamydomonas*-Gameten ausgeschiedenen identisch ist oder nur wie dieser wirkt.

Das gelbe Aglykon aus Crocus-Pollen gibt in wäßriger Lösung leicht einen Komplex mit Borsäure. Schüttelt man z. B. die wäßrige Lösung mit verd. Natriumbicarbonatlösung von p_H 8, so geht nichts in Lösung. Verwendet man dagegen verdünnten Boratpuffer von genau gleichem p_H, so erhält man eine gelbe, lebhaft grün fluoreszierende Lösung. Auch mit Boressigsäureanhydrid gibt das Aglykon schon in der Kälte eine gelbe, stark fluoreszierende Lösung, während sein Glykosid auf dieses Reagens nicht anspricht. Offenbar ist im Glykosid eine für die Bildung des Borsäure-Komplexes wesentliche Hydroxylgruppe an der Bindung der 2 Glucosereste beteiligt.

Für die *Wirkungsweise der Borsäure als geschlechtsbestimmender Stoff* ergibt sich damit das folgende Bild: ♂-Zellen scheiden sowohl Gynotermon (gelbes Aglykon) wie Androtermon (Oxyaldehyd) aus. Damit eine ♀-Zelle sich wie ein ♀-Gamet verhält, muß sie in eine Lösung gebracht werden, die einen Überschuß an gelbem Aglykon enthält; damit sie wie ein ♂-Gamet kopuliert, muß ein Überschuß an Oxyaldehyd vorhanden sein. Die dafür notwendige Konzentrationsverschiebung läßt sich auf *zweierlei Art* erreichen. Entweder man bringt die ♀-Zellen in eine Lösung des *Oxyaldehyds* oder in eine solche von Borsäure, die das Gynotermon nach dem Schema Aglykon + Borsäure $\rightleftharpoons$ Aglykon · Borsäure inaktiviert.

Das Aglykon des Glykosids aus Crocuspollen schmilzt unscharf um 265° unter Zersetzung. Es gibt bei der Analyse Werte, die auf ein annähernd äquimolares Gemisch einer methoxylfreien Verbindung $C_{15}H_{10}O_7$ und einer methoxylhaltigen $C_{16}H_{12}O_7$ passen. Durch Einwirkung von Diazomethan erhielten wir einen einheitlichen Tetramethyläther $C_{19}H_{18}O_7$, der ohne Zersetzung bei 159—160° scharf schmolz. Der Mischschmelzpunkt mit Quercetintetramethyläther vom Schmp. 159—160° ergab keine Depression. Da reines Quercetin ohne jede Termonwirkung ist, dürfte der wirksame Bestandteil des Aglykons ein *Methyläther des Quercetins* (I) sein. Der 7-Methyläther (Rhamnetin) und 3'-Methyläther (Isorhamnetin) sind bekannt und sollen geprüft werden. Der 5-Methyläther kommt, da das Pollenglykosid keinen Borsäurekomplex liefert, nicht in Frage. Die Spezifität des Termons erhellt daraus, daß wie Quercetin auch andere Flavone, Morin, Daidzein, Genistein und zwei zur Verfügung gestellte Dimethoxy-Genisteine, unwirksam waren. Wenn von dem Pollenaglykon nur der methoxylhaltige Anteil Wirkstoff ist, so ergibt sich, daß von diesem ~ 5 Molekeln genügen, um einer Zwitterzelle gegenüber ♂-Gameten weiblichen Charakter aufzuprägen[4]).



Die vorliegenden Versuche haben einen ersten Einblick in die physiologische Wirkungsweise der Borsäure eröffnet, nachdem die lebenswichtige Bedeutung des Bors als Spurenelement schon an zahlreichen Pflanzen erkannt worden ist. Darüber hinaus wird im vorliegenden Falle ein funktioneller Gegensatz zwischen den wasserlöslichen gelben Farbstoffen und den Carotinoiden ersichtlich, denen wir bei so vielen Pflanzen nebeneinander begegnen. Es ist wahrscheinlich, daß nicht nur bei einzelligen Grünalgen, sondern auch beim Crocus und anderen Blütenpflanzen, wo die Borsäure vielfach in den Narben besonders angereichert ist, ähnliche Reaktionen für den Ablauf des Befruchtungsvorganges von Bedeutung sein werden.

Heidelberg, Kaiser Wilhelm-Institut für Medizinische Forschung, den 14. Mai 1942.

Institut für Chemie:
RICHARD KUHN. IRMENTRAUT LÖW.

Institut für Biologie: FRANZ MOEWUS.

[1]) R. KUHN, F. MOEWUS u. G. WENDT, Ber. dtsch. chem. Ges. **72**, 1702 (1939). — R. KUHN u. I. Löw, Ber. dtsch. chem. Ges. **74**, 219 (1941). — F. MOEWUS, Erg. Biol. **18**, 287 (1941).

[2]) R. KUHN u. F. MOEWUS, Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 547 (1940).

[3]) R. KUHN, I. Löw u. F. MOEWUS, Naturwiss. **1942**, 373.

[4]) Handelt es sich um einen Dimethyläther des Quercetins, so würden ~2,5 Molekeln je Zelle genügen.

Besprechung.

DÜLL, BERNHARD, **Wetter und Gesundheit. Teil I:** Die Reaktionszeitbestimmung als Testmethode zur Feststellung von Einflüssen des Wetters und der Sonnentätigkeit auf den gesunden Menschen. (Wissenschaftliche Forschungsberichte. Naturwissenschaftliche Reihe. Herausgegeben von R. E. LIESEGANG. Band 54.) Dresden u. Leipzig: Theodor Steinkopff 1941, XI, 103 Seiten 46 Abb., brosch. RM. 8.50, geb. RM. 10.—.

Der Einfluß des Wetters auf psychische und physische Vorgänge im Menschen war seit langem Gegenstand der Untersuchung besonders seitens der kritisch beobachtenden Ärzte. Aber den von Patienten gemachten Angaben über die Erscheinungen der „Wetterfühligkeit" (Veränderung der Stimmung und Gemütsverfassung) und der „Wetterempfindlichkeit" (Schmerzempfindungen in allen Abstufungen) haftet der Mangel des subjektiven Charakters der Beobachtungen an. Der Verfasser sucht demgegenüber nach objektiven Feststellungsmethoden, bei denen der gesunde Mensch als Versuchsperson dient, jedenfalls solche Menschen, die bestimmten Testversuchen gegenüber keine pathologischen Störungen und Reaktionen zeigen. Die Testmethoden sind ja in der modernen Psychologie, in der Berufsberatung u. a. außerordentlich weit entwickelt, und zwar sowohl auf dem experimentalphysiologischen Gebiete (Blutdruck, Pulsfrequenz, Sauerstoffverbrauch usw.) wie auf dem Gebiete des Gefühls- und Stimmungslebens, der psychischen Beschaffenheit des Individuums (Psychotechnik).

Als Grundlage für seine Untersuchungen benützt Dr. DÜLL die Messung der Reaktionszeit, d. i. der Zeit, die verstreicht zwischen einem bestimmten Sinnesreiz und der in Form einer Bewegung willkürlicher Muskeln (Handbewegung, Sprachorgan) erfolgenden Antwort auf den Reiz. Als Reize werden verwendet unter Benützung des Bildfunkempfängers der Deutschen Fultograph G. m. b. H. Licht- und Schallreize. Im Augenblick des Aufblitzens z. B. des Lichtsignals betätigt die Vp. so schnell wie möglich einen Taster. Die Zeit zwischen Signal und Tasterdruck wird mit größter Exaktheit gemessen. Die Versuche werden täglich um 7, 13 und 19 Uhr, auch sonntags ausgeführt. Die Tätigkeit, die Schlafdauer, die Ernährung und das Wohlbefinden der Vp. wird zugleich täglich genau notiert.

Es ist sicher, daß auf diese Weise ein wertvolles Beobachtungsmaterial gewonnen werden kann, das den Vorteil der zahlenmäßigen Bewertbarkeit, der Vergleichbarkeit und der völligen Eindeutigkeit und Reproduzierbarkeit besitzt.

Auf die Ergebnisse im einzelnen einzugehen, würde zu weit führen. Bemerkenswert ist, daß die schon von anderen gemachte Feststellung bestätigt wurde, daß die RZ. auf Licht und Schall beim weiblichen Geschlecht im Mittel ein wenig länger ist als beim männlichen Geschlecht. Von erheblichem Einfluß kann natürlich der Genuß von Medikamenten und Rauschgiften sein. Abnorm groß erwies sich die Verlangsamung der Reaktion bei Hirnverletzten. Auch die Art der Reizgebung ist von Einfluß: Lichtreizung hat eine wesentlich längere RZ. als Schallreizung.

In das eigentliche Untersuchungsgebiet führen hinein die Feststellungen der Abhängigkeit der RZ. von der Tageszeit, auch ein jährlicher Gang scheint sich, soweit das Material erkennen läßt, einzustellen (schnellere Reaktion im Herbst, langsamere im Sommer und Winter). Hier wären weitere Untersuchungen besonders für die Zeit der „Frühjahrskrise" erwünscht. Der Verf. macht auch den Versuch, Rhythmen im Verlaufe der RZ. nachzuweisen, doch scheint mir dafür das Material noch nicht ausreichend.

Die erste Gruppe der physikalischen Umweltfaktoren, die untersucht wurde, umfasst die lokale Witterung, also Lufttemperatur, Luftdruck, Niederschlag, Sichtweite usw., die zweite die Großwetterlage, d. i. die „atmosphärische Aktivität", Depressionscharakter, Sturmhäufigkeit u. ä. Bei der ersten Gruppe wurden z. T. frühere Ergebnisse (BREZINA, SCHMIDT u. a.) bestätigt, z. T. neue bemerkenswerte Feststellungen gemacht. Es scheint bei Betrachtung eines etwaigen Einflusses von „Luftkörpern" (Polarluft, Tropikluft und ihre Abstufungen), daß Polarluft sowohl als lagernder wie als einbrechender Luftkörper die Reaktionszeit verlängert. Der Einfluß kann bei einem Luftkörper, der lagert, verschieden sein von der Einwirkung desselben Luftkörpers, wenn er im Zustand des Vorstoßes sich befindet, doch gibt hier das Material von DÜLL im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Forscher (Fronteneinfluß!) kein eindeutiges Bild.

Viel deutlicher ist der Einfluß der Großwetterlage, worauf ja zahlreiche Untersuchungen anderer Forscher schon hingewiesen haben.

Nicht ohne Bedenken wird man die Hinzunahme der „solaren Einflußsphäre" zu den Gegenständen der Untersuchung betrachten. Magnetische Stürme, Polarlichter, Sonnenflecken, Ionosphärenstürme, Erdstromstörungen, Funkempfangsstörungen und ihr Einfluß auf Empfinden und Leistung des Menschen: das scheint mir bedenkliche Perspektiven zu eröffnen für neue „Berufskrankheiten" und Versorgungsansprüche u. ä., und mit wahrer Erleichterung liest man die Feststellung: „Eine ungünstige Wirkung solarer Teilcheneinbrüche auf die Reaktionszeit läßt sich (an Hand des zur Verfügung stehenden Materials) jedenfalls nicht feststellen." Natürlich haben solche Untersuchungen ihren großen heuristischen Wert und tragen bei zur Klärung des ganzen Fragenkomplexes und zur Ermittlung bis jetzt vielleicht noch unbekannter oder nicht genügend beobachteter physikalischer oder atmosphärischer Prozesse, die großen Einfluß auf den Organismus haben können. Aber Vorsicht und Zurückhaltung sind hier am Platze. Demgemäß gibt der gewissenhafte und zuverlässig arbeitende Autor sein hypothetisches „Wirkungsschema" solcher Störungen auch „mit allem Vorbehalt". Vorbehalte sind auch am Platze gegenüber der Feststellung des praktischen Einflusses verlängerter Reaktionszeit z. B. bei Straßen- und Verkehrsunfällen. Besonders wetterfühlige Menschen müssen eben besonders vorsichtig sein.

Jedenfalls ist das exakte inhaltsreiche Werk ein wertvoller Beitrag zu diesen ganzen die Allgemeinheit lebhaft interessierenden Fragen. WEICKMANN.

Herausgeber und verantwortlicher Redakteur: FRITZ SÜFFERT, Berlin W 9.
Springer-Verlag in Berlin W 9. — Druck der Spamer A.-G. in Leipzig.